



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par :

Céline VERDIER

le mardi 14 janvier 2014

Titre :

De la souris à l'homme : de l'endocytose des lipoprotéines HDL via la voie de la F1ATPase-P2Y13 aux variants géniques impactant le métabolisme du HDL et leur association au risque cardio-vasculaire

École doctorale et discipline ou spécialité :

ED BSB : Physiopathologie

Unité de recherche :

INSERM U1048 - Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires (I2MC) - équipe 5

Directeur(s) de Thèse :

Pr Bertrand PERRET et Dr Laurent MARTINEZ

Jury :

Pr Bertrand CARIOU - rapporteur

Dr Anatol KONTUSH - rapporteur

Dr Jean-Bernard RUIDAVETS - examinateur

Pr Bertrand PERRET - directeur de thèse

Dr Laurent MARTINEZ - directeur de thèse

A mes grands-parents

Remerciements

Monsieur le Professeur CARIOU et **Monsieur le Docteur KONTUSH**, je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail. Je vous prie de trouver ici le témoignage de ma reconnaissance.

Monsieur le Docteur RUIDAVETS, vous avez accepté avec beaucoup de gentillesse de vous plonger dans ce manuscrit afin d'évaluer mon travail. Soyez assuré de ma gratitude. Je vous remercie également pour toutes les analyses statistiques passées et futures... qui sont souvent bien obscures pour la profane que je suis.

Monsieur le Professeur Bertrand PERRET, je vous remercie pour votre soutien, votre disponibilité (malgré tous vos engagements !) ainsi que la qualité de vos conseils et de votre encadrement scientifique.

Monsieur le Docteur Laurent MARTINEZ, je te remercie pour avoir accepté de me prendre en thèse dans ton laboratoire ainsi que pour avoir supervisé ce travail (qui fût de longue haleine...). Merci également pour tous ces conseils qui nous ont permis d'avancer.

Je voudrais aussi remercier tous les membres de l'équipe 5 de l'I2MC (mention spéciale pour Annelise) ainsi que les anciens locataires de feu le bâtiment C pour leur gentillesse et leur soutien.

Je remercie également Céline Besson, Hélène Coppin et Marie-Paule Roth pour leurs conseils avisés concernant le génotypage et les analyses génétiques. Dans le même sens, merci aux équipes des plateaux génomique et transcriptomique de Purpan (Laure Buisson) et de Ranguel (Jean-José Maoret et Frédéric Martins).

Des remerciements sont également à adresser à tout le personnel du laboratoire hospitalier de Biochimie Purpan et plus particulièrement à Emmanuelle (que je prive de ses précieux thermocycleurs assez régulièrement).

Enfin, last but not least, un grand merci à mes amis et à ma famille pour vos encouragements. Pierre en particulier pour toutes les années passées et à venir... Je sais bien que c'est compliqué, mais je suis sûre qu'un jour vous comprendrez tous ce que je fais vraiment dans la vie !

Table des matières

Remerciements.....	2
Résumé.....	8
Liste des abréviations.....	10

CHAPITRE I : D'UNE ALTÉRATION DU MÉTABOLISME LIPIDIQUE AU DÉVELOPPEMENT DE LA PLAQUE D'ATHÉROME 15

A) L'athérosclérose :	16
a. Physiopathologie :	16
b. Epidémiologie :	24
B) Relations entre athérosclérose et métabolisme lipidique :	25
a. Les lipoprotéines plasmatiques :	25
b. Lien entre lipoprotéines et plaque d'athérome :	29
C) Traitement actuel des dyslipidémies :	30
a. Traitement des hyperLDLémies :	31
i. Les statines :	31
ii. Les résines échangeuses d'ions :	34
iii. Les inhibiteurs de l'absorption intestinale de cholestérol :	35
iv. Nouvelles thérapeutiques :	36
1. Oligonucléotides anti-sens anti-apoB :	37
2. Inhibiteurs de PCSK9 :	38
3. Inhibiteurs de MTP :	39
b. Hypolipémiants : les fibrates	40

CHAPITRE II : LES LIPOPROTÉINES DE HAUTE DENSITÉ (HDL) 45

A) Classification et structure :	46
a. Classification :	46
b. Composition :	48
i. Protéome :	49
ii. Lipidome :	52
iii. Métabolome :	52
iv. Transcriptome :	55
B) Métabolisme :	56
a. Biosynthèse et remodelage plasmatique :	56
i. Mécanisme général :	56
ii. Les partenaires :	57
1. ApoA-I (NP_000030.1) :	57
2. ABCA1 (NP_005493.2) :	59
3. ABCG1 (AAL06598.1) :	60
4. CLA-1 / SR-BI :	61
5. LCAT (AAB34898.1) :	62
6. PLTP :	63
7. CETP :	64
8. Les lipases :	65
a. Les lipases endothéliale et hépatique :	65
b. La lipoprotéine lipase :	67
b. Catabolisme :	68
i. Dégradation hépatique :	68
1. CLA-1 / SR-BI :	69
2. Voie de la F1-ATPase/P2Y ₁₃ :	70

a. La F ₁ -ATPase :	72
b. P2Y ₁₃ :	73
ii. Dégradation rénale :	75
C) Propriétés :	75
a. Le transport retour du cholestérol :	75
b. Activité anti-oxydante :	77
c. Protection endothéliale :	78
d. Activité anti-inflammatoire :	81
e. Activité anti-thrombotique :	83
f. Rôle dans le système immunitaire et propriétés anti-infectieuses :	85
g. Homéostasie du glucose :	87
h. Lien avec l'obésité :	90
i. Transport des miRNA :	92
D) Article sur les HDL-thérapies :	92
 CHAPITRE III : L'APPORT DE LA GÉNÉTIQUE	106
A) Généralités :	107
a. Les principales mutations génétiques rencontrées :	108
b. Introduction aux études d'association pangénomique (GWAS) :	114
i. Présentation :	114
ii. Limites :	115
B) Lien entre HDL et génétique :	119
a. Mutations monogéniques et taux de HDL-C :	119
i. HypoHDLémie :	119
1. Mutations du gène de l'apoA-I :	119

2. Déficit en ABCA1 et maladie de Tangier (OMIM 205400) :.....	123
3. Déficit en LCAT :.....	125
4. Déficit en LPL (OMIM 238600) :.....	127
ii. HyperHDLémie :	127
1. Déficit en CETP (OMIM 118470) :.....	127
2. Déficit en lipase hépatique :.....	132
3. Mutations portant sur SR-BI :.....	132
b. L'approche multigénique des GWAS pour prédire les taux de HDL-C :.....	134
C) Existe-t-il un lien entre les SNP modulant les taux de HDL-C et le risque coronarien ?.....	143
D) Limites, conclusion, perspectives et alternatives aux GWAS :.....	153
CHAPITRE IV : RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX	157
A) Relation entre mutation du gène codant la lipase hépatique et la maladie coronarienne :	158
a. Introduction :	158
b. Article 1 :.....	160
c. Conclusion :.....	168
B) Résultats préliminaires dans l'étude des mutations touchant <i>P2RY13</i> et impactant le métabolisme lipidique :.....	170
a. Introduction :	170
b. Matériel et méthodes :	170
i. Séquençage :	170
ii. Génotypage :.....	171
c. Résultats:.....	171
d. Discussion :.....	181
C) Rôle du récepteur <i>P2Y₁₃</i> dans la captation hépatique du cholestérol.....	185

a.	Introduction	185
b.	Article 2 :	186
c.	Conclusion :	194
D)	Effets de l'activation chronique du récepteur P2Y₁₃ :	197
a.	Introduction :	197
b.	Article 3 :	197
c.	Conclusion :	205
CHAPITRE V : PERSPECTIVES		207
A)	P2Y₁₃ : une cible potentielle pour lutter contre l'athérosclérose ?	208
B)	Polymorphismes de P2RY₁₃ et des autres partenaires du métabolisme des HDL : 208	
BIBLIOGRAPHIE		212
ABSTRACT		243

Résumé

De nombreuses études épidémiologiques ont établi le rôle athéroprotecteur du HDL-cholestérol. Les HDL exercent des effets pléiotropes sur les cellules vasculaires, endothéliales notamment. Toutefois, leur capacité protectrice vis-à-vis de l'athérosclérose est principalement attribuée à leur fonction de transporteur retour du cholestérol des cellules périphériques jusqu'au foie, où il est éliminé. Dans notre laboratoire, nous avons identifié un nouveau mécanisme de captation hépatique des HDL, c'est la voie de la F_1 -ATPase/ $P2Y_{13}$. Schématiquement, la liaison de l'apolipoprotéine A-I sur la chaîne β de la F_1 -ATPase dans sa localisation membranaire, déclenche l'hydrolyse de l'ATP ; l'ADP généré active le récepteur purinergique $P2Y_{13}$ qui stimule alors la capture de l'holoparticule HDL par un troisième récepteur dont l'identité reste inconnue.

La première partie de mes travaux s'est articulée autour de la recherche des modulations d'expression génique dans le foie de souris invalidées pour *p2ry13* ainsi que dans le foie de souris soumises pendant trois jours à un agoniste partiel de $P2RY_{13}$. Ainsi, chez les souris invalidées pour *p2ry13* dont le profil lipoprotéique plasmatique était retrouvé inchangé, nous avons mis en évidence une diminution d'expression d'*abca1* et *abcg1*. Chez des souris dont la voie de captation était stimulée de façon chronique par l'agoniste de $P2RY_{13}$, les mécanismes adaptatifs semblent être différents puisque ces souris présentaient des taux abaissés de cholestérol HDL (total et libre) et une augmentation significative d'expression d'*hmgcr* et *hmgcs* (impliqués dans la néosynthèse de cholestérol) du *ldlr* et de *srebp2*, qui est un gène régulateur des précédents.

Nous nous sommes ensuite attachés à évaluer l'impact de différents polymorphismes génétiques associés au métabolisme des HDL, sur les taux de HDL-C et sur le risque cardiovasculaire dans le cadre d'une étude cas-témoins sur l'infarctus du myocarde. Cette étude composée d'environ 800 hommes coronariens stables appariés à 800 témoins issus de la population générale nous a permis d'identifier le rs1800588 (situé dans *LIPC* codant la lipase hépatique) comme étant un facteur indépendant d'une valeur péjorative de l'index systolique bras-cheville chez les patients coronariens. Cette mutation est également associée à la maladie coronarienne dans des conditions normotriglycéridémiques. Nous avons également étudié un ensemble de SNP composé d'une part de SNP déjà connus comme étant associés aux taux de HDL-cholestérol (*CETP*, *LIPC*, *LIPG*...) et d'autre part de SNP localisés dans les gènes de cette nouvelle voie de captation du HDL (*P2Y13*, *ATP5B*...). Les premiers résultats nous laissent penser que l'association des rs1466684 (mutation non-sens, M179T dans *P2RY13*) et rs3732757 (mutation silencieuse, acide aminé 80 de $P2RY_{13}$) serait liée à un phénotype cardio-protecteur (moindre fréquence cardiaque et augmentation significative des taux

de la lipoprotéine A1). Ces polymorphismes pourraient conditionner l'expression du récepteur P2RY₁₃.

Les modulations d'activité de la voie F₁-ATPase/P2Y₁₃ chez la souris ont confirmé l'importance du récepteur P2Y₁₃ dans le transport retour du cholestérol avec l'existence de régulations géniques permettant de compenser les modulations de cette voie sur le profil lipoprotéique. Les premiers résultats chez l'homme nous laissent également espérer que cette voie pourrait être d'importance majeure dans le métabolisme du cholestérol HDL avec l'existence de polymorphismes qui pourraient moduler le profil lipoprotéique plasmatique et le risque coronarien.

Liste des abréviations

ABC : Adenosine Triphosphate Binding Cassette

ABCA1 : Adenosine Triphosphate Binding Cassette transporter A1

ABCG1 : Adenosine Triphosphate Binding Cassette transporter G1

ABI : Ankle-Brachial Index ou index bras-cheville

ACAT : Acylcoenzyme A/Cholestérol Acyl Transférase

ACC : acétylcoenzyme A carboxylase

AMPK : AMP-activated protein kinase

Apo : apolipoprotéine

ApoA-I : apolipoprotéine A-I

ARNm : acide ribonucléique messenger

ASO : oligonucléotides anti-sens

BAD : Bcl-2-Associated Death promoter

BCL-XL : B-Cell Lymphoma-eXtra Large

BMP-1 : Bone Morphogenic Protein-1

CAD : sujet souffrant de maladie coronarienne

CF6 : facteur couplant 6

CML : Cellules Musculaires Lisses

CNV : Copy Number Variant ou variation du nombre de copies

CETP : Cholesteryl Ester Transfer Protein ou protéine de transfert des esters de cholestérol

dNTP : désoxyNucléotide Tri Phosphate

eNOS : NO synthase endothéliale

EPC : Cellules Progénitrices Endothéliales

ERK1/2 : Extracellular signal-Regulated Kinase 1/2

FRS : Facteur de Risque Standard

GENES : Génétique et ENvironnement en Europe du Sud

GSPx : glutathion peroxydase

GWAS : Genome-Wide Associations Studies ou études d'association pangénomique

HALP : HyperAlphaLipoProtéinémies

HDL : lipoprotéines de haute densité

HDL-C : HDL-cholestérol

Hpr : Haptoglobin related protein

HMG-CoA : 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A

HPRT : Hypoxanthine PhosphoRybosylTransférase

HR : Hazard Ratio

ICAM-1 : Inter Cellular Adhesion Molecule-1 ou molécule inter-cellulaire d'adhésion-1

IDL : lipoprotéines de densité intermédiaire

IDM : Infarctus Du Myocarde

IF1 : Inhibitory Factor 1

IL-8 : interleukine-8

IMC : Indice de Masse Corporelle

JAK2 : Janus Kinase 2

KO : Knock-Out

LCAT : Lécithine Cholestérol Acyl Transférase

LDL : lipoprotéines de basse densité

LDLox : LDL oxydées

LE : Lipase endothéliale

LH : Lipase Hépatique

LIMIC : Low- and Middle-Income Countries (pays en voie de développement)

lncRNA : long noncoding RNA

LOX-1 : Lectin-like oxidized LDL receptor

Lp(a) : lipoprotéine (a)

LPL : Lipoprotéine Lipase

LPS : Lipopolysaccharide

LRP : LDL Related Protein

LXR : Liver X Receptor

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase

MCP-1 : Monocyte Chemoattractant Protein-1 ou protéine chimioattractante-1

M-CSF : Macrophage Colony-Stimulating Factor

MIGen : Myocardial Infarction Genetics Consortium

miRNA : microRNA

MRE : Éléments de Reconnaissance des miRNA

MTP : protéine microsomale de transfert des triglycérides

NCBI : National Center for Biotechnology Information

NO : monoxyde d'azote ou oxide nitrique

NPC1L1 : Niemann-Pick C1-like 1

nsSNP : mutation non silencieuse

OMIM : Online Mendelian Inheritance in Man

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PAF : Platelet-Activating Factor

PAF-AH : platelet-activating factor acétylhydrolase

PAI-1 : Plasminogen Activator Inhibitor-1

PCPE2 : Procollagen C-Proteinase Enhancer-2

PCR : Polymerase Chain Reaction ou réaction de polymérisation en chaîne

PCSK9 : proprotéine convertase subtilisine/kexine de type 9

PLTP : PhosphoLipid Transfer Protein ou protéine de transfert des phospholipides

PolyPhen : Polymorphism Phenotyping

PON1 : paraoxonase

PPAR α : Peroxisome Proliferator-Activating Receptors

qPCR : quantitative Polymerase Chain Reaction

QSP : Quantité Suffisante Pour

RCT : transport retour du cholestérol

RE : Réticulum Endoplasmique

RFLP : polymorphisme de longueur des fragments de restriction

RNA : RiboNucleic Acid ou acide ribonucléique

ROS : espèces réactives de l'oxygène

RXR : Retinoid X Receptor

SCAP : SREBP-cleavage activating protein

SIFT : Sorts Intolerant From Tolerant

siRNA : petits ARN interférents

SNP : Single Nucleotide Polymorphism ou polymorphisme d'un seul nucléotide

snRNA : small nuclear RNA

SR-BI : Scavenger Récepteur classe B type I

SREBP-2 : Sterol Regulatory Element Binding Protein-2

sSNP : mutation synonyme

STAT3 : Signal Transducer and Activator of Transcription 3

STR : Short Tandem Repeat ou microsatellite

TBP : TATA-Binding Protein

TG : triglycérides

TLF1 : Trypanolytic Factor 1 ou facteur trypanolytique 1

TNF- α : Tumor Necrosis Factor- α ou facteur de nécrose tissulaire- α

UCP1 : protéine découplante mitochondriale

VCAM-1 : Vascular Cellular Adhesion Molecule-1 ou molécule d'adhésion aux cellules vasculaires-1

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor ou facteur de croissance de l'endothélium

VLA-4 : Very Late Antigen 4

VLDL : lipoprotéines de très basse densité

VNTR : Variable Number of Tandem Repeats ou nombre variable de répétitions en tandem ou minisatellites

CHAPITRE I :

**D'UNE ALTÉRATION DU MÉTABOLISME
LIPIDIQUE AU DÉVELOPPEMENT DE LA
PLAQUE D'ATHÉROME**

A) L'athérosclérose :

a. Physiopathologie :

De la strie lipidique à la rupture de la plaque athéromateuse, l'athérosclérose est une pathologie faisant intervenir plusieurs stades évolutifs successifs. En 1954, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) en a proposé une définition : « L'athérosclérose est une association variable de remaniements de l'intima des artères de gros et moyen calibre consistant en une accumulation locale de lipides, de glucides complexes, de sang et de produits sanguins, de tissu fibreux et de dépôts calcaires ; le tout s'accompagnant de modifications de la média ». Pour bien comprendre cette définition, il faut tout d'abord se rappeler la structure des artères. La paroi des vaisseaux sanguins est formée par trois tuniques : la tunique interne (intima) en contact avec le sang, la tunique moyenne (média) et la tunique externe (adventice) (figure 1).

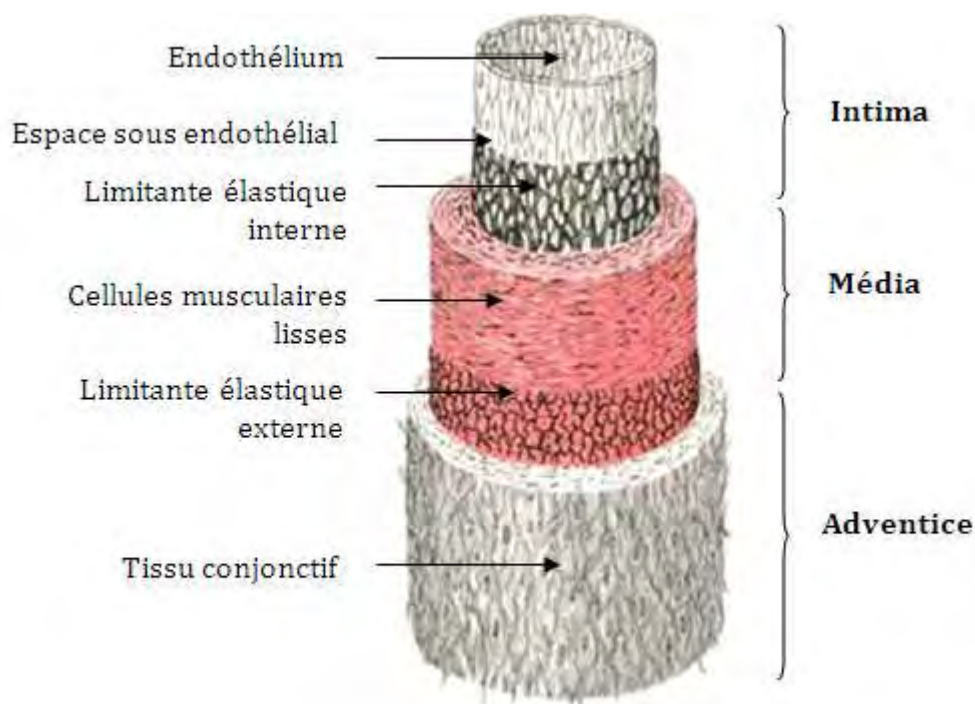


Figure 1 : structure d'une paroi artérielle typique avec les ultra-structures de chacune des tuniques. D'après le site 123bio.net, Jérôme Léoni (Léoni, 2001).

L'**endothélium** est constitué d'une monocouche de cellules endothéliales (correspondant à un épithélium squameux simple) et possède de nombreuses fonctions :

- rôle de barrière aux composés sanguins : perméabilité sélective aux molécules selon leurs structures chimiques.

- fonctions régulatrices de la coagulation : synthèse de nombreux médiateurs pro-coagulants (facteur de von Willebrand, facteur tissulaire, phospholipides...) et anti-coagulants (protéines C et S, héparanes sulfates, activateur du plasminogène...). A l'état physiologique, l'endothélium exerce ses fonctions anti-thrombogéniques et anti-coagulantes afin de préserver l'intégrité du vaisseau, mais lors de la création d'une brèche vasculaire, la mise en contact de l'espace sous-endothélial et des composés sanguins entraîne la formation d'un thrombus.

- contrôle des résistances périphériques : libération de divers facteurs vasomoteurs agissant sur les cellules musculaires lisses permettant ainsi de rétablir une tension artérielle normale. Parmi ces molécules vasoactives, on retrouve notamment l'oxyde nitrique et la prostacycline qui sont vasodilatatrices et d'autre part, l'endothéline ainsi que les anions superoxydes qui sont vasoconstricteurs.

- rôle dans l'inflammation : lorsqu'il y a agression au niveau du mur vasculaire, un processus inflammatoire se met en place et l'endothélium augmente sa perméabilité tout en modifiant le profil d'expression des molécules d'adhésion. Le recrutement des leucocytes fait d'abord intervenir des chimiokines (cytokines chimioattractantes) produites par les cellules endothéliales dont l'interleukine-8 et la protéine chimioattractante-1 (MCP-1). Sous l'effet de cytokines pro-inflammatoires comme le facteur de nécrose tissulaire- α (TNF- α), les sélectines P et E faiblement exprimées en conditions basales voient leur expression augmenter. Ces protéines transmembranaires permettent aux leucocytes circulants de ralentir et de « rouler » le long de l'endothélium avant de s'immobiliser complètement par l'intermédiaire de deux molécules d'adhésion, la molécule intercellulaire d'adhésion-1 (ICAM-1) et la molécule d'adhésion aux cellules vasculaires-1 (VCAM-1). Ces deux protéines sont également peu exprimées à l'état normal et ce sont les cytokines pro-inflammatoires produites qui augmentent très fortement leur expression. Après avoir adhéré à l'endothélium, les polynucléaires neutrophiles et les monocytes peuvent pénétrer par diapédèse à travers la jonction endothéliale afin d'atteindre le tissu sous-endothélial.

- rôle dans l'angiogénèse : les cellules endothéliales ont un taux de renouvellement très lent avec une durée de vie d'environ trente ans (Toborek & Kaiser, 1999). Elles ont toutefois la capacité de proliférer et de migrer en cas d'inflammation ou de lésion du tissu. En effet, elles possèdent la capacité de synthétiser le facteur de croissance de l'endothélium (VEGF) ou facteur de croissance de l'endothélium vasculaire en réponse à l'hypoxie. Cette protéine intervient physiologiquement dans l'angiogénèse qui accompagne les phénomènes d'embryogénèse, de croissance et de développement des organes et intervient en situation pathologique dans la rétinopathie diabétique et dans les cancers.

En dessous de cette fine couche de cellules endothéliales, se trouve la **média** qui est également touchée par l'athérosclérose. C'est la plus épaisse des trois tuniques composant la structure de la paroi vasculaire et elle est essentiellement composée de tissu élastique et de cellules musculaires lisses empilées en couches et formant des unités lamellaires. Cette tunique est très épaisse dans les artères mais devient très fine dans les veines voire même indistincte des autres couches dans les capillaires. La présence des cellules musculaires lisses permet aux artères de participer au système de contraction-relâchement imposé par le système nerveux végétatif et par les substances vasoactives produites par l'endothélium. Entourant les deux tuniques précédentes et formant la couche externe de la paroi du vaisseau, se trouve l'**adventice** qui est majoritairement composée de collagène. Celle-ci est irriguée par les *vasa vasorum* (réseau vasculaire de petite taille) qui, en se ramifiant et en pénétrant dans la média, permettent également de l'irriguer. La composition en chacune de ces tuniques varie suivant le calibre du vaisseau et alors que les grandes artères sont riches en élastine afin de canaliser les fortes variations de pression artérielle, les artères de plus petit calibre sont composées essentiellement de tissu musculaire (Léoni, 2001).

L'initiation de la plaque d'athérome se fait *via* l'infiltration de l'intima par les lipoprotéines LDL que nous étudierons de manière plus détaillée dans le deuxième paragraphe. L'accumulation ces lipoprotéines dans l'espace intimal est suivie de leur oxydation (LDLox), ce qui les rend davantage pro-athérogène. Les LDL ne semblent pas s'oxyder dans la circulation mais dans le mur artériel. Les lipides polyinsaturés subissent dans un premier temps l'action de radicaux libres oxygénés, et notamment du radical OH[•], lui-même formé secondairement à la production d'anion superoxyde. Plusieurs enzymes

sont impliquées dans la génération de radicaux libres oxygénés et dans la peroxydation lipidique (myeloperoxydase, NADPH oxydase, lipoxygénase) (H. Yoshida & Kisugi, 2010)(H. Yoshida & Kisugi, 2010). La peroxydation des acides gras polyinsaturés conduit à la génération en chaîne des radicaux peroxy et de peroxydes lipidiques et finalement, à la fragmentation des chaînes d'acides gras et à la libération d'aldéhydes. Les aldéhydes et radicaux libres générés pouvant notamment modifier des nucléotides et des protéines. Les LDL oxydées (LDLox) sont extrêmement pro-athérogènes et participent notamment à la stimulation de l'expression de molécules d'adhésion à la surface endothéliale (ICAM-1 et VCAM-1) ainsi qu'à la sécrétion par les cellules endothéliales de molécules chimio-attractantes comme MCP-1 (Macrophage Colony Protein-1) et de facteurs de croissance comme le M-CSF (Macrophage Colony-Stimulating Factor) (Young & Mceneny, 2001). ICAM-1 et VCAM-1 fixent les monocytes qui pénètrent à travers l'endothélium et qui se différencient dans un deuxième temps en macrophages. Ces macrophages peuvent alors capter les LDL oxydées grâce à des récepteurs éboueurs ou « scavengers ». Contrairement au récepteur des LDL, ces récepteurs ne sont pas soumis à un rétrocontrôle négatif du contenu intracellulaire en cholestérol, ce qui explique leur capacité à internaliser de grandes quantités de LDL modifiées. Les récepteurs scavengers principalement impliqués sont les récepteurs SR-AI et CD36 (tableau 1).

		Lipoprotéines ligands			
Classe	Membre	LDL acétylées	LDL oxydées	LDL	HDL
SR-A	SR-AI	+	+	-	
	SR-AII	+	+	-	
	SR-AIII	+	+	-	
SR-B	SR-BI	+	+	+	+
	SR-BII	+	+	+	+
	CD36	+/-	+	-	+
SR-D	Macrosialine	+	+	-	
SR-E	LOX-1	+/-	+	-	

Tableau 1 : membres des différentes classes de récepteurs scavengers présents à la surface des macrophages. Un + indique la liaison au récepteur, un – l'absence de liaison et l'absence de signe indique l'absence de données à ce sujet. LOX-1 : Lectin-like oxidized LDL receptor. D'après (de Villiers & Smart, 1999).

Un résumé des étapes clés des modifications oxydatives des LDL et du recrutement monocytaire est proposé figure 2.

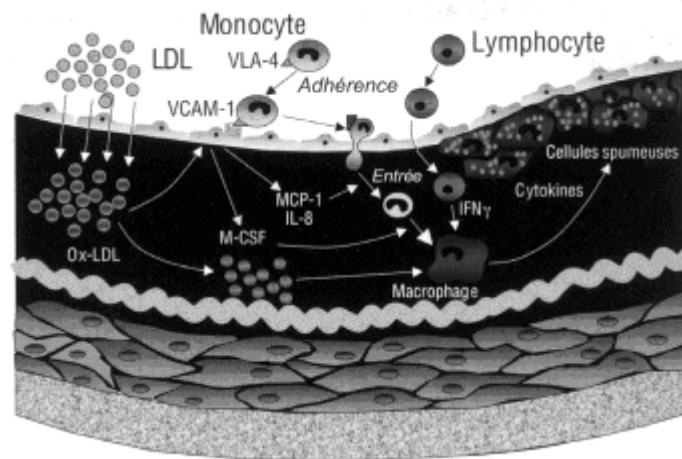


Figure 2 : étapes clés de la formation des stries lipidiques. L'accumulation des LDL suivie de leur oxydation en lipides oxydés pro-inflammatoires dans l'espace sous-intimal est accompagnée par l'expression endothéliale de molécules d'adhésion comme VCAM-1 qui permet aux monocytes d'y adhérer grâce au Very Late Antigen 4 (VLA-4). Parallèlement, les cellules endothéliales produisent des facteurs chémoattractants comme MCP-1 ou l'interleukine-8 (IL-8). Les monocytes peuvent alors pénétrer à travers la barrière endothéliale pour se transformer en macrophages puis en cellules spumeuses après captation des LDL oxydées (Ox-LDL). D'après (Tedguy & Chapman, 2004).

A ce stade, la réaction inflammatoire devient chronique et va précipiter les événements même si pour l'instant ne sont observées que des stries lipidiques. L'accumulation de lipides dans et au dehors des cellules permet la constitution du cœur de l'athérome. Progressivement, une chape fibro-musculaire constituée de cellules musculaires lisses provenant de la média mais aussi de collagène, d'élastine et de protéoglycanes recouvre l'athérome et l'isole de la lumière artérielle qui se rétrécit dangereusement. Le risque ischémique devient alors majeur avec une diminution du flux vasculaire qui est responsable d'un état d'hypo-oxygénation des tissus situés en aval. Cette évolution se déroule sur de nombreuses années et on considère que pour qu'une plaque soit responsable de manifestations ischémiques chroniques, il faut qu'il y ait une sténose réduisant la lumière artérielle de plus de 50% par rapport à un segment sain adjacent (Bauters, n.d.). La description anatomique retient trois stades : strie lipidique, lésion fibro-lipidique et lésion compliquée. Stary, en 1995, a complété cette classification et propose six stades successifs de gravité croissante évoluant avec l'âge (tableau 2).

Nomenclature et type histologique	Principal mécanisme	Âge de survenue
Type I (lésion initiale) macrophages spumeux isolés	Croissance par accumulation lipidique	Dès l'enfance
Type II (strie lipidique) accumulation de lipides intra-cellulaires		
Type III (lésion intermédiaire) modification du type II avec accumulation de quelques dépôts lipidiques extra-cellulaires		Dès la trentaine
Type IV (lésion athéromateuse) modification du type II avec de multiples dépôts lipidiques extra-cellulaires		
Type V (lésion fibroathéromateuse) chape fibreuse recouvrant le noyau lipidique avec présence de calcification	Prolifération des cellules musculaires lisses, dépôt de collagène	Dès la quarantaine
Type VI (lésion compliquée) rupture de la chape fibreuse avec formation d'un thrombus, présence d'hémorragie ou d'hématome	Thrombose et hématome	

Tableau 2 : classification des lésions d'athérosclérose. D'après (Stary et al., 1995).

Cette maladie inflammatoire chronique de l'intima des grosses artères peut ainsi être schématiquement représentée selon la figure 3.

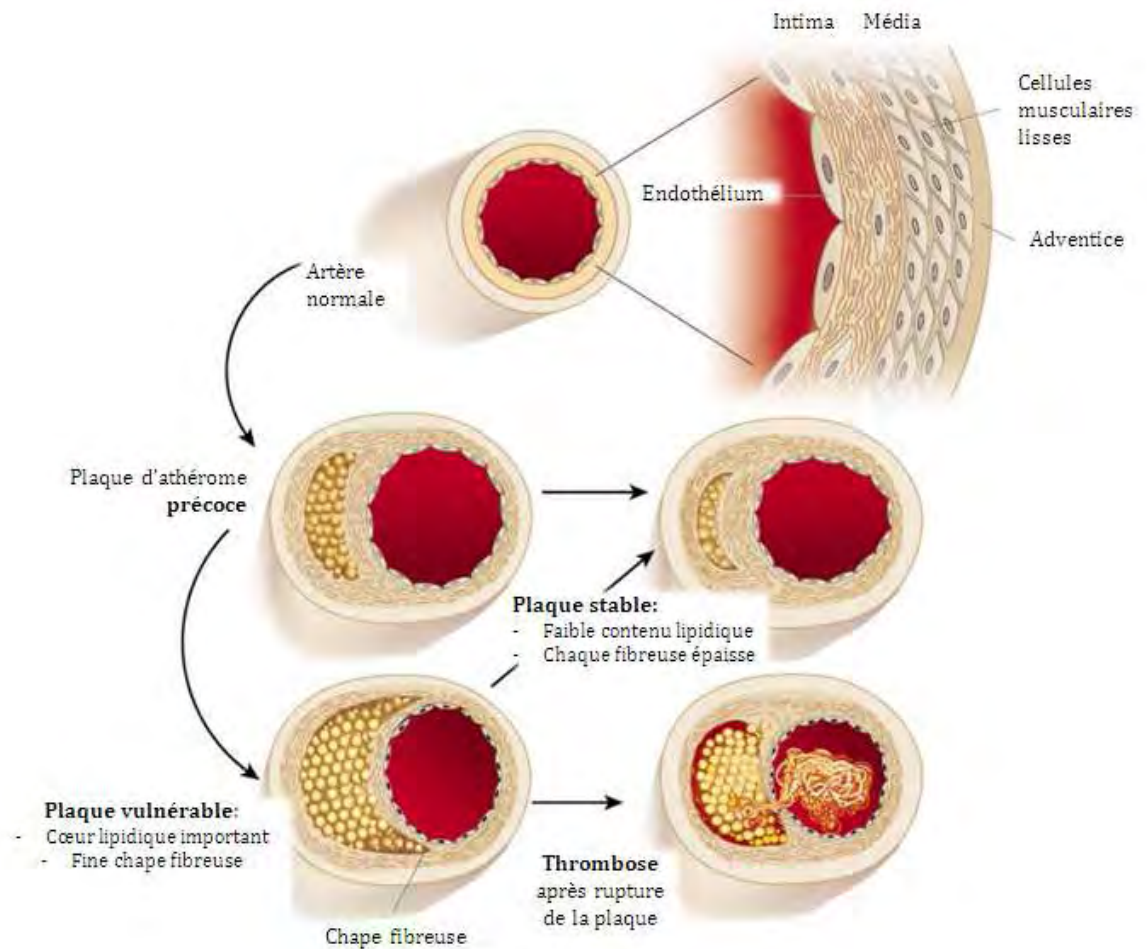


Figure 3 : pathogénèse de l'athérosclérose, déroulement probable. D'après (Libby, 2012).

Il est également important de noter que certains agents infectieux contribuent à promouvoir l'inflammation dans la plaque. De nombreux pathogènes ont en effet été retrouvés au sein des plaques d'athérome sans qu'ils ne soient présents dans les vaisseaux sains. Parmi ces organismes, on retrouve notamment des bactéries comme *Chlamydia pneumoniae*, certains organismes parodontaux tel que *Porphyromonas gingivalis*, *Helicobacter pylori* mais aussi des virus comme le Cytomegalovirus (M. E. Rosenfeld & Campbell, 2011).

Le processus athérosclérotique atteint de façon variable les petites et grosses artères et demeure silencieux de nombreuses années avant d'évoluer le plus souvent de façon brutale. L'accident aigu survient suite à une érosion ou une rupture de la plaque : la mise en contact du sang et des composés du cœur lipidique active le processus de coagulation avec

comme conséquence la formation d'un thrombus. Dans certains cas, le phénomène est spontanément résolutif sans signe majeur mais si la thrombose se développe jusqu'à occlusion complète, la nécrose tissulaire survient dans le territoire situé en aval. La taille de la plaque est par ailleurs moins importante pour les accidents aigus que pour les pathologies chroniques puisque 70% à 85% des infarctus du myocarde (IDM) surviennent alors qu'il y a moins de 30% de sténose (Mallika, Goswami, & Rajappa, 2007). Les facteurs de rupture de la plaque sont maintenant assez bien cernés : les facteurs intrinsèques dépendants de la structure de la plaque sont les plus importants. Parmi ceux-ci, la proportion relative en lipides et en tissu fibreux représente la vulnérabilité de celle-ci (quand la chape fibreuse est fine et que le cœur lipidique est important, le risque de rupture est plus grand). Dans le cœur de la plaque, la proportion de macrophages activés, le pourcentage de cellules en apoptose et la rupture de néo-vaisseaux jouent également un rôle important (Bauters, n.d.).

b. Epidémiologie :

L'athérosclérose atteint de nombreuses artères et peut donc se révéler sous plusieurs formes. Les atteintes coronaires représentent une part importante de la pathologie cardiaque avec l'angor (stable et instable), l'IDM et la mort subite. L'atteinte des artères crâniennes et extra-crâniennes (accidents vasculaires cérébraux) ainsi que celle des artères fémorales (claudication, ischémie des membres inférieurs) représentent aussi une large part des symptômes. Dans une moindre mesure, la formation d'anévrismes au niveau de l'aorte peut survenir (mécanismes physiopathologiques peu connus).

L'OMS a évalué qu'en 2008, 29% des morts dans le monde étaient dues à des pathologies cardio-vasculaires. Parmi ces 17,3 millions de décès, 7,3 millions étaient secondaires à une pathologie coronarienne et 6,2 millions à des pathologies cérébro-vasculaires. L'organisme évalue par ailleurs qu'en 2030, plus de 23 millions de personnes mourront d'une maladie cardio-vasculaire (OMS/WHO, 2013, fact sheet 317). Concernant l'Europe, il semble y avoir un gradient nord-sud avec des taux annuels d'apparition d'évènements coronaires plus élevés dans le nord de l'Europe (Irlande, Écosse, Finlande) que dans le sud (Portugal, Espagne, France). Alors que les pays développés sont en train de réguler la mortalité liée aux pathologies cardio-vasculaires grâce aux modifications des comportements à risque et à l'amélioration de la prise en charge, les pays en voie de

développement (les « Low- and Middle-Income Countries » ou LIMIC) sont de plus en plus touchés (80% des morts mondiales). L'explosion démographique aidant, différentes études prévoient que l'augmentation de mortalité sera trois fois plus importante dans les LIMIC que dans les pays développés (Gersh, Sliwa, Mayosi, & Yusuf, 2010). On voit donc que l'athérosclérose constitue maintenant un fléau mondial touchant la globalité des pays voyant leurs habitudes de vie modifiées. La prise en charge précoce de ces pathologies est donc un des principaux enjeux du XXI^{ème} siècle ce qui implique donc de trouver de nouvelles approches thérapeutiques pour compléter l'arsenal actuel.

B) Relations entre athérosclérose et métabolisme lipidique :

a. Les lipoprotéines plasmatiques :

Ces macromolécules de structure sphérique sont composées d'une partie lipidique et d'une partie protéique. Elles comportent notamment en leur cœur des lipides hydrophobes (**cholestérol estérifié** et **triglycérides** (TG)) et en périphérie des substances amphipathiques tels que des **phospholipides**, du **cholestérol non estérifié** ou bien encore des protéines qui sont spécifiques de chacune des classes de lipoprotéines, les **apolipoprotéines** (ou apo) (figure 4).

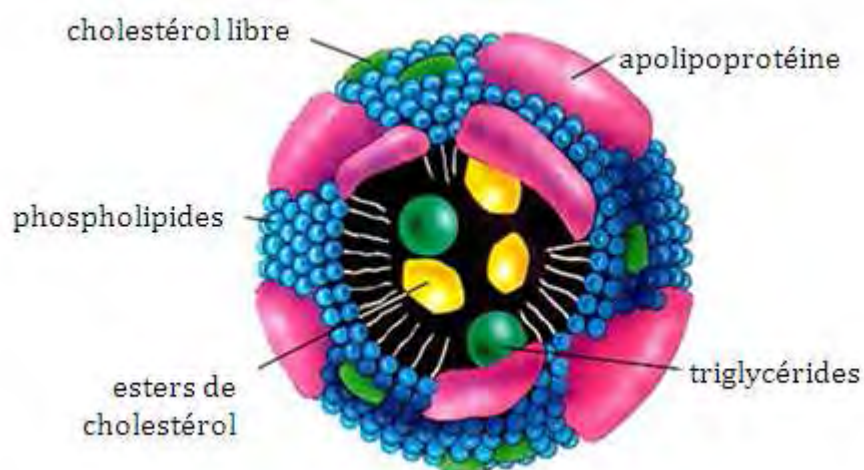


Figure 4 : structure d'une lipoprotéine. D'après la fondation suisse de cardiologie (Fondation Suisse de Cardiologie, n.d.).

Leur rôle est en particulier de transporter les lipides (hydrophobes donc par nature non retrouvés sous forme libre dans le plasma) dans les différents compartiments de

l'organisme. Il existe cinq grandes classes de lipoprotéines : les chylomicrons, les lipoprotéines de très basse densité (VLDL), les lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL), les lipoprotéines de basse densité (LDL) et les lipoprotéines de haute densité (HDL) qui sont elles mêmes divisées en deux sous-classes, HDL2 et HDL3). Comme nous pouvons le déduire de leur nom, elles possèdent des densités différentes ce qui est lié aux proportions de lipides qui sont différentes entre elles. Outre leur différence de densité et de composition, elles sont également dissemblables par la taille, leur masse moléculaire moyenne, leurs apolipoprotéines majeures ou leurs caractéristiques fonctionnelles (tableau 3 et figure 5).

Lipoprotéines	Diamètre (nm)	Masse moléculaire (Da)	Apo principales	Origine	Durée de demi-vie plasmatique	Proportion dans un sérum normal (12h de jeûne)	Fonction principale
Chylomicron	100-1000	$5 \cdot 10^9$	B-48, A-I, C-II, C-III, E	intestin	10-20 minutes	0%	transport des TG exogènes
VLDL	30-70	$7,5 \cdot 10^6$	B-100, C-II, C-III, E	foie	4-6 heures	5-10%	transport des TG endogènes + précurseurs des LDL
LDL	15-25	$2,5 \cdot 10^6$	B-100, E	catabolisme des VLDL <i>via</i> les IDL	3-4 jours	50-55%	transport du cholestérol
HDL	6-14	$3 \cdot 10^5$	A-I, A-II	foie-intestin + catabolisme des chylomicrons et VLDL	3-4 jours	40-45%	transport retour du cholestérol

Tableau 3 : Composition et caractéristiques fonctionnelles des lipoprotéines circulantes. D'après le Livre de biochimie médicale- marqueurs actuels et perspectives (Durand & Beaudoux, 2008).

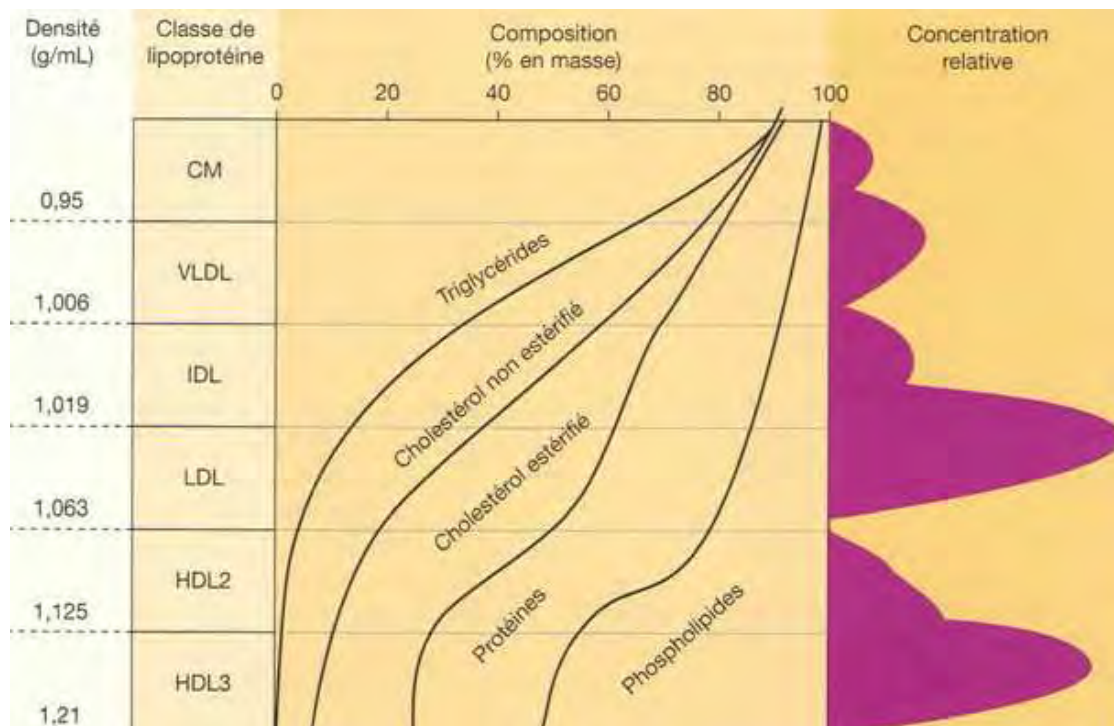


Figure 5 : Classification, composition et densité des lipoprotéines isolées par ultracentrifugation (Durand & Beaudeau, 2008). CM : chylomicron ; VLDL : lipoprotéines de très basse densité ; IDL : lipoprotéines de densité intermédiaire ; LDL : lipoprotéines de basse densité ; HDL : lipoprotéines de haute densité.

Brièvement, le cholestérol en participant à la constitution des membranes cellulaires ou à la biosynthèse de nombreuses hormones est essentiel à la vie. Il permet en effet de rigidifier et de stabiliser les membranes cellulaires en s'intercalant entre les phospholipides de la bicouche lipidique. Il participe également en tant que précurseur dans la biosynthèse de nombreuses hormones comme le calcitriol, le cortisol ou l'aldostérone, les oestrogènes ou la testostérone mais aussi les acides biliaires. Outre sa synthèse endogène par le foie d'environ 0,6 à 0,9 grammes par jour, le cholestérol peut être absorbé. Il provient alors de deux sources : l'alimentation (0,1 à 1 gramme par jour) et le cholestérol biliaire (1 à 4 grammes par jour), page 538 (Toussaint, Jacob, Lagrost, & Chapman, 2003). Alors que le cholestérol alimentaire est transporté par les **chylomicrons** néo-synthétisés par les entérocytes avant de gagner la circulation sanguine par les capillaires lymphatiques, la synthèse du cholestérol endogène se fait de façon continue sous la forme de **VLDL** par les hépatocytes. Ces VLDL sont soumises à un fort remodelage vasculaire par différentes lipases avant de donner respectivement les **IDL** et les **LDL**. C'est le **LDL** qui constitue alors le principal donneur de cholestérol aux cellules et tissus périphériques. Concernant le **HDL**, qui

fera l'objet du chapitre suivant, son rôle majeur est le transport retour du cholestérol, mécanisme qui permet de ramener le cholestérol cellulaire excédentaire vers le foie où il est éliminé directement ou après transformation en acides biliaires vers les fèces.

b. Lien entre lipoprotéines et plaque d'athérome :

L'importance du cholestérol dans le développement de la plaque ne fait plus de doute depuis que différentes études sur les statines (médicaments inhibant la synthèse du cholestérol) ont montré que les patients traités présentaient une forte diminution des mortalités coronariennes et totales (12% de réduction de mortalité globale par mmol/L de baisse de LDL-cholestérol dans une méta-analyse publiée en 2005 par les collaborateurs du Cholesterol Treatment Trialists) (Baigent *et al*, 2005). Il est maintenant reconnu que le potentiel délétère du cholestérol n'est pas le même suivant qu'il est transporté par les lipoprotéines HDL ou les lipoprotéines VLDL/LDL. En effet, le HDL-cholestérol (« bon cholestérol ») est connu pour son effet protecteur vis-à-vis de la formation des plaques d'athérome alors que le rôle du LDL-cholestérol (« mauvais cholestérol ») n'est plus discuté dans l'athérogénèse. Comme nous l'avons vu, l'oxydation des LDL déclenche le recrutement des monocytes ce qui conduit à la constitution des stries lipidiques. L'accumulation de ces lipoprotéines dans l'intima reflète un déséquilibre entre les entrées et les sorties. On comprend alors bien que des taux plasmatiques élevés de LDL-cholestérol constituent un événement favorisant le développement de la plaque d'athérome. Au contraire, des taux élevés de HDL-cholestérol sont maintenant reconnus par différentes études épidémiologiques comme étant protecteurs vis-à-vis de l'athérosclérose comme nous le verrons plus loin. La prise en charge actuelle des pathologies athérosclérotiques repose en grande partie sur le contrôle et la normalisation des dyslipidémies. Les traitements sont principalement axés sur la réduction des taux de LDL-cholestérol, les statines sont d'ailleurs des médicaments de première ligne qui permettent de réduire le risque relatif d'accidents coronariens d'environ 30% (Toussaint *et al*, 2003).

C) Traitement actuel des dyslipidémies :

Les mesures hygiéno-diététiques sont un élément clé de la prise en charge des dyslipidémies. Nous avons vu que le cholestérol était soit apporté par l'alimentation, soit issu d'une synthèse endogène. Il existe donc deux cibles possibles pour réduire les taux de cholestérol sanguin. La première approche réside en une approche nutritionnelle (tableau 4). Outre limiter de façon logique l'apport alimentaire de cholestérol, il est maintenant reconnu que certains nutriments peuvent abaisser le taux plasmatique de LDL-cholestérol en interférant avec le métabolisme digestif et le cycle entéro-hépatique du cholestérol alimentaire. C'est en particulier le cas pour les **phytostérols** qui sont des composés d'origine végétale possédant un noyau stérol et qui sont donc structurellement proche du cholestérol. Cela a pour conséquences d'engendrer des comportements physico-chimiques similaires et finalement de diminuer la solubilisation du cholestérol et donc son absorption. De plus, bien que cela soit encore débattu, les phytostérols pourraient activer le récepteur nucléaire Liver X Receptor (LXR) entraînant ainsi une augmentation de l'expression des ATP Binding Cassette (ABC) G5 et G8 dans l'entérocyte. Ces transporteurs entérocytaires peuvent alors effluer une plus grande quantité de cholestérol de l'entérocyte vers la lumière intestinale. Il a également été montré que les phytostérols pourraient interférer avec l'acylcoenzyme A/cholestérol acyl transférase (ACAT) entérocytaire inhibant ainsi la formation des chylomicrons (Brufau, Canela, & Rafecas, 2008). Différentes études ont aussi montré que les **protéines de soja** avaient un impact positif sur la diminution du taux de LDL-cholestérol d'autant plus grand que celui-ci était élevé à la base. Les mécanismes d'action pourraient être multiples et passeraient par différents composants de ces protéines (acide phytique, saponines et isoflavones). Aucun mécanisme majeur ne semble pour l'instant être clairement établi. Que l'objectif thérapeutique soit ou non atteint, le traitement diététique doit être conservé au long terme.

		Résultats sur la baisse du cholestérol-LDL
Acides gras saturés	< 7% des apports énergétiques /jour	10%
Cholestérol alimentaire	< 200 mg/jour	5%
Poids	Perte de 5 kg	5%
Fibre soluble	5-10 g/jour	5%
Protéines de soja	25 g/jour	5%
Stérols végétaux	1-3 g/jour	10%
	Total	30-40%

Tableau 4 : effets additifs potentiels des différentes approches non médicamenteuses sur la diminution des taux de LDL-cholestérol. D'après page 552, (Toussaint *et al*, 2003).

Concernant les traitements actuels, les principales molécules utilisées sont les statines en première intention en cas d'hypercholestérolémie pure ou mixte. Les fibrates sont quant à eux prescrits lors d'hypertriglycéridémie résistante à la diététique et uniquement en deuxième intention pour les hypercholestérolémies en cas d'intolérance aux statines (voir section I-C-b.). Leur niveau de preuve d'efficacité est toutefois plus faible que celui des statines comme nous le verrons. D'autres médicaments sont également cités dans les références, c'est le cas de la colestyramine utilisée pour les hypercholestérolémies isolées ou de l'ézétimibe. Cette dernière molécule est indiquée dans les hypercholestérolémies primaire et familiale homozygote. Toutefois, n'ayant pas montré de bénéfice sur la morbidité cardiovasculaire son utilisation n'est recommandée qu'en deuxième intention en cas d'échec ou d'intolérance aux statines (recommandations Reco du Vidal).

a. Traitement des hyperLDLémies :

i. **Les statines :**

L'effet essentiel des statines réside en leur capacité à diminuer fortement les concentrations plasmatiques en LDL-cholestérol (de 20 à 50%). Ces molécules sont des inhibiteurs de la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A réductase (HMG-CoA réductase) qui est une enzyme limitante dans la biosynthèse endogène du cholestérol. Elle intervient

dans une étape située en tout début de cascade et permet la réduction de l'HMG-CoA en mévalonate (figure 6).

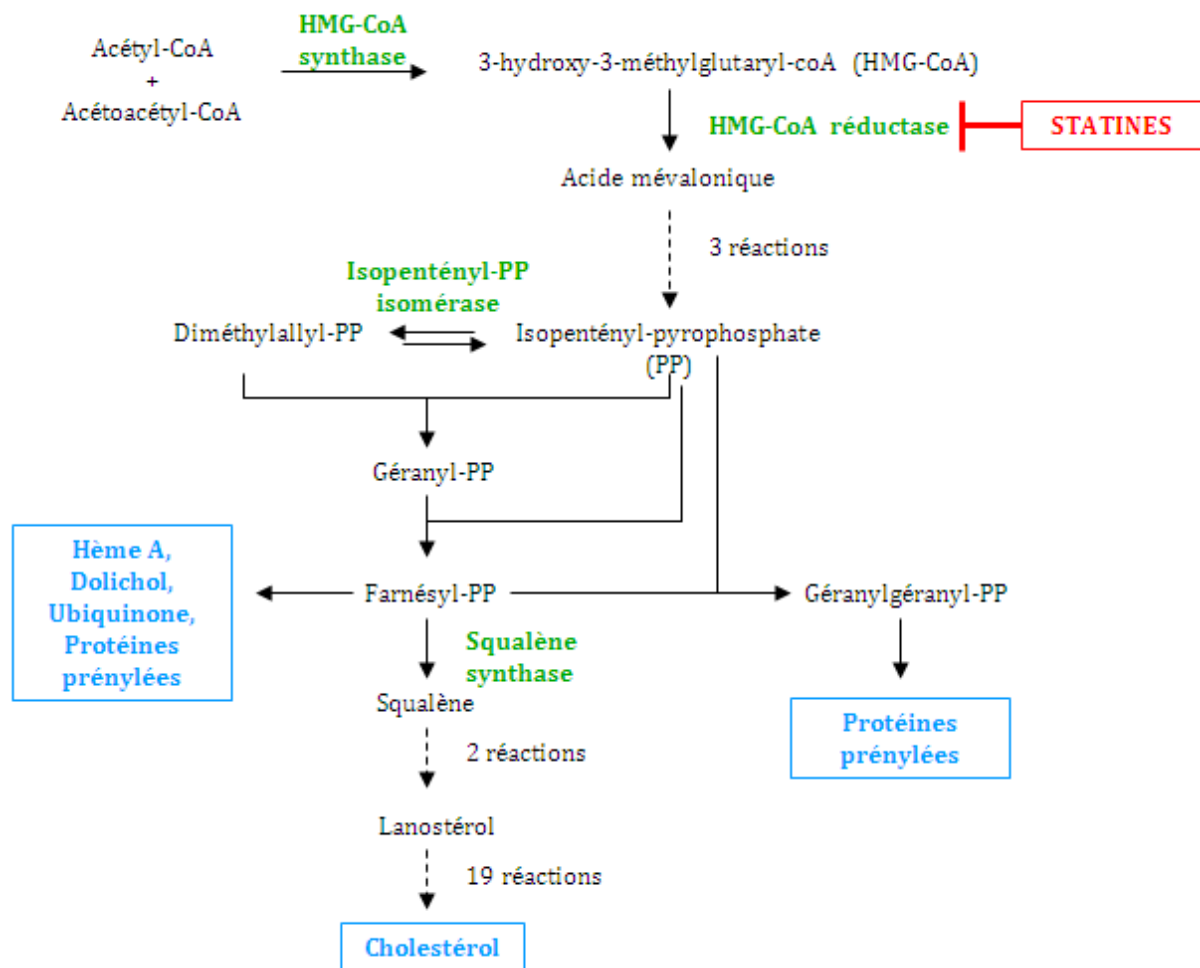


Figure 6 : voie simplifiée de la biosynthèse du cholestérol. Les principales enzymes impliquées sont notées en vert et les produits majeurs de cette voie de synthèse en bleu. Les statines (molécules inhibitrices de l'HMG-CoA réductase) sont en rouge. Coa : coenzyme A, PP : pyrophosphate D'après (Wikipedia).

L'inhibition de cette voie entraîne une diminution de la concentration intra-hépatique en cholestérol. Le phénomène compensant cette diminution est l'augmentation de l'expression des récepteurs hépatocytaires aux LDL (récepteur à l'apoB/E : B ligand des LDL et E ligand des IDL et des remnants) ce qui induit donc une augmentation de leur clairance hépatique. Il y a ainsi une diminution des concentrations plasmatiques en LDL-cholestérol. Les pourcentages de diminution varient selon la molécule et la dose prescrite, le tableau 5 suivant permet de visualiser ces variations.

Statine (DCI)	20 mg/j	40 mg/j	80 mg/j
Fluvastatine	- 20%	- 28%	- 31%
Pravastatine	- 24%	- 30%	ND
Simvastatine	- 35%	- 39%	- 46%
Atorvastatine	- 43%	- 48%	- 51%
Rosuvastatine	- 52%	- 55%	ND

Tableau 5 : réduction du taux de LDL-cholestérol par rapport à la concentration initiale après six semaines de traitement suivant le type et la dose de statine utilisée (Lièvre & Cucherat, 2006). ND : non déterminé.

Concernant le métabolisme lipidique, les statines sont aussi connues pour augmenter (mais de façon moindre) les concentrations de HDL-cholestérol (moins de 10%) et de sa protéine majeure l'apolipoprotéine A-I (apoA-I). Ceci est lié à la baisse de production du géranylgéranyl pyrophosphate. Cet isoprénoïde se lie à de nombreuses protéines cellulaires dont Rho, une petite GTPase, qui est capable de diminuer l'activité de PPAR α (Peroxisome Proliferator-Activating Receptors). PPAR α est un récepteur nucléaire qui module l'expression de nombreux gènes et qui est en particulier impliqué dans la stimulation de la transcription de l'apoA-I. On comprend alors que la diminution de synthèse du géranylgéranyl pyrophosphate permet d'abaisser l'activité de la protéine Rho et donc d'augmenter l'activité de PPAR α (Martin *et al*, 2001). Une autre cause possible d'augmentation des taux de HDL-cholestérol pourrait passer par une moindre activité de la Cholesteryl Ester Transfer Protein (CETP ou protéine de transfert des esters de cholestérol) qui est secondaire à la baisse des taux de VLDL et LDL (Nicholls *et al*, 2007). A côté de ces effets majeurs, sont associés ce que l'on appelle des effets pléiotropes qui englobent une amélioration des fonctions endothéliales, une diminution de l'inflammation ainsi que des effets anti-thrombotiques et anti-oxydants. Gérald Luc dans son article de 2002 passe en revue les différents mécanismes d'action des statines (Luc, 2002). Brièvement, au niveau de la paroi artérielle, l'augmentation de la synthèse de monoxyde d'azote (NO) et la diminution de l'endothéline (peptide

vasoconstricteur) améliorent la vasomotricité de la fonction endothéliale. La diminution du nombre de macrophages et de lymphocytes T au sein même de la plaque d'athérome, ainsi que la diminution de la prolifération des cellules musculaires lisses, associée à une réduction de production de métalloprotéases dégradant la partie fibreuse de la plaque participent à sa stabilisation. Concernant les effets anti-thrombotiques, ils passent par une diminution d'expression du Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1) qui inhibe la fibrinolyse et par une diminution d'expression du facteur tissulaire (déclencheur de la coagulation par la voie extrinsèque) : l'effet global est une diminution de la capacité à former des thrombi et donc à obstruer les artères en cas de plaque instable. Ces molécules sont utilisées en première ligne depuis que de nombreuses études ont montré un bénéfice majeur dans la réduction de la mortalité cardio-vasculaire. Par exemple, les collaborateurs du Cholesterol Treatment Trialists (CTT) ont réalisé une méta-analyse publiée dans The Lancet de quatorze essais cliniques englobant au total 90056 patients et couvrant la période de 1994 à 2004, les molécules utilisées ainsi que les doses varient suivant les études (simvastatine, lovastatine, pravastatine, fluvastatine et atorvastatine) (Baigent *et al*, 2005). Les résultats à cinq ans ont montré une diminution de 12% de la mortalité globale et de 19% de la mortalité coronaire par mmol/L en moins de LDL-cholestérol. Toutefois, en raison des effets indésirables et du risque cardio-vasculaire résiduel important, le traitement des dyslipidémies ne passe pas que par ces molécules et d'autres classes médicamenteuses bien que moins utilisées sont d'un recours précieux.

ii. Les résines échangeuses d'ions :

La seule résine échangeuse d'ions commercialisée en France est la **colestyramine**. Elle est indiquée dans le traitement de l'hypercholestérolémie isolée en deuxième intention et elle peut être associée aux fibrates ou aux statines (Recos Vidal). Constituée d'un squelette polymérique chargé positivement, elle permet la captation intestinale des acides biliaires chargés négativement qui seront dans un deuxième temps éliminés dans les fèces avec la colestyramine. La diminution du pool d'acides biliaires d'environ 40% suite à l'arrêt du cycle entéro-hépatique permet d'augmenter la transcription de gènes impliqués dans leur biosynthèse comme le gène codant le cytochrome 7A1 ou de gènes intervenant dans la captation du cholestérol circulant comme le gène codant le récepteur hépatique aux LDL.

Ces mécanismes permettent d'augmenter la synthèse d'acides biliaires compensant ainsi leur moindre réabsorption. La conséquence sur le bilan lipidique est donc une forte diminution du taux plasmatique de LDL-cholestérol (15 à 26%) avec des effets maximaux observés dès les deux premières semaines (Insull, 2006). Cette diminution des taux de LDL-cholestérol est associée à des conséquences cliniques favorables puisque Insull dans sa revue nous informe que pour une moyenne de traitement de 7,4 ans de cholestyramine seule, les patients ont eu une réduction significative de 19% du risque cardio-vasculaire associée à une réduction de 13% des taux de LDL-cholestérol et des triglycérides. L'association aux autres molécules ciblant les lipides a également été étudiée. L'ajout d'une statine permet des effets complémentaires et additifs puisque l'HMG-CoA réductase est régulée positivement suite à la déplétion en acides biliaires et le blocage de cette enzyme ne peut être que favorable avec une réduction des taux de LDL-cholestérol pouvant aller jusqu'à 56%. La co-administration à des fibrates permettrait également d'améliorer le profil lipidique. Cependant, une des associations les plus intéressantes pourrait être l'adjonction de niacine qui pourrait diminuer le LDL-cholestérol de 20 à 40% et augmenter le HDL-cholestérol de plus de 40%. Toutefois, Insull souligne qu'une trithérapie associant une résine échangeuse d'ions, une statine et la niacine pourrait être plus efficace comparativement à une mono ou une bithérapie mais que des études supplémentaires sont nécessaires.

iii. Les inhibiteurs de l'absorption intestinale de cholestérol :

Actuellement, l'**ézétimibe** représente le seul inhibiteur de l'absorption intestinale du cholestérol. Son mécanisme d'action passe par la molécule native et son glucuronide qui lors du cycle entéro-hépatique bloquent sélectivement le transporteur entérocytaire des stérols appelé la protéine Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1). En conséquence, le cholestérol est moins bien absorbé et est moins délivré au foie. Il s'en suit une augmentation de l'expression hépatocytaire du LDL récepteur ce qui entraîne une augmentation de la clairance hépatique du cholestérol. Cela aboutit à une diminution significative des taux de LDL-cholestérol de 7 à 18% tout en sachant qu'il existe une certaine variabilité interindividuelle possiblement liée aux variations génétiques d'expression de NPC1L1 (Kalogirou et al, 2010). Au-delà des taux de LDL, l'ézétimibe agirait différemment suivant la taille des lipoprotéines LDL, certaines études retrouvent une diminution de concentration de

l'ensemble des fractions alors que d'autres montreraient une diminution plus prononcée des petites LDL qui sont les plus athérogènes. Il existerait aussi une légère hausse du HDL-cholestérol (non significative) qui n'est pas retrouvée dans toutes les études. Concernant maintenant l'efficacité clinique, les résultats ne sont pas aussi élogieux que ce que la diminution des taux de LDL-cholestérol pourrait laisser supposer. Effectivement, l'association de cette molécule à des statines, que ce soit dans l'étude ENHANCE (Ezetimibe and Simvastatin in Hypercholesterolemia Enhances Atherosclerosis Regression) ou dans l'étude SANDS (Stop Atherosclerosis in Native Diabetics) n'entraîne pas de régression de l'épaisseur de l'intima-média carotidienne (marqueur de pathologie cardio-vasculaire) par rapport à l'administration de la statine seule (Kalogirou *et al*, 2010). Récemment, de nouvelles données contradictoires jettent un peu plus le trouble puisque si Hayek *et al* (Hayek *et al*, 2013) trouvent un effet protecteur avec une réduction des événements majeurs liés à l'athérosclérose ainsi qu'une diminution de la mortalité globale, ce n'est pas le cas dans l'étude de Patel (Patel *et al*, 2013).

iv. Nouvelles thérapeutiques :

Malgré l'utilisation des statines qui lorsqu'elles abaissent le taux de LDL-C de 1 mmol/L (40mg/dL) permettent de diminuer les événements coronariens majeurs de 23%, il reste un risque cardio-vasculaire résiduel de 77% (Baigent *et al*, 2005). L'augmentation de doses de ces molécules ne se fait toutefois pas sans problème puisque leur usage est associé à de graves effets indésirables. Il est en particulier reconnu que toutes les statines peuvent entraîner des troubles musculaires aigus (myalgies, faiblesses musculaires, augmentation de la créatine-kinase) régressant à l'arrêt du traitement. Ce mécanisme de myotoxicité passe par l'inhibition de la synthèse de métabolites non cholestérols qui sont situés en aval de l'HMG-CoA (figure 6). L'ubiquinone (ou coenzyme Q10) naturellement présente dans toutes les cellules humaines et qui intervient dans la chaîne respiratoire est notamment affectée. L'absence de prénylation de ce coenzyme permet d'expliquer l'altération du fonctionnement de la chaîne respiratoire et du défaut de production énergétique qui est vitale pour le muscle et qui explique par conséquent l'insuffisance musculaire. Il y a donc une réelle nécessité d'associer plusieurs molécules ayant des mécanismes d'action différents afin d'obtenir une efficacité hypocholestérolémiante supplémentaire. Dans ce contexte, ces

dernières années, de nouvelles molécules ayant des mécanismes d'action novateurs ont été synthétisées. Leur utilisation est toutefois restreinte à des patients présentant des taux très élevés de cholestérol en raison de leurs effets indésirables pouvant être sévères.

1. *Oligonucléotides anti-sens anti-apoB :*

Les oligonucléotides anti-sens (ASO) sont des brins courts de 8 à 50 déoxyribonucléotides se liant à un ARNm (acide ribonucléique messager) cible pour en inhiber sa traduction. Afin d'inhiber l'expression du gène de l'apoB (qui code l'apoB-48 des chylomicrons et l'apoB-100 des VLDL/IDL/LDL indispensables à leur structure), un ASO de deuxième génération a vu le jour sous le nom de ISIS 301012 ou **mipomersen** (Genzyme). Cette molécule est responsable d'effets dose-dépendants et les premiers essais chez l'homme ont montré, chez le groupe à 200mg, une diminution des taux d'apoB de 50% et de LDL-C de 35% (Kastelein *et al*, 2006). Ces taux restent par ailleurs significativement abaissés jusqu'à trois mois après la dernière dose. D'autres essais ont depuis été conduits dans des populations hypercholestérolémiques et notamment chez des sujets atteints d'hypercholestérolémie familiale et se sont également avérés positifs (tableau 6). La Food and Drug Administration a récemment approuvé sa mise sur le marché américain pour traiter les hypercholestérolémies familiales homozygotes. En Europe et en France cette molécule n'est toujours pas commercialisée, probablement en raison de ses nombreux effets indésirables. En effet, sont retrouvés entre 80-100% de réactions locales au niveau du site d'injection, 30 à 50% de syndromes pseudo-grippaux mais également une tendance à une augmentation des taux intra-hépatiques de triglycérides à court-terme ce qui limiterait donc son usage aux personnes à risque accru de stéatose comme les obèses ou les diabétiques (T. R. Joy, 2012).

Population	LDL-C de base mg/dL (mmol/L)	Evolution des taux par rapport à la base (%)				
		LDL-C	Apo-B	Lp(a)	Triglycérides	HDL-C
HF homozygote	439 (11.35)	-25	-27	-31	-18	+15
hypercholestérolémie sévère	276 (7.14)	-36	-36	-33	-9	+6
HF hétérozygote	153 (3.96)	-28	-26	-21	-14	+3
+ CAD						
hypercholestérolémie	123 (3.18)	-37	-38	-24	-26	+2
+ haut risque CAD						

Tableau 6 : Impact du mipomersen sur le bilan lipidique ajouté aux doses maximales tolérées du traitement optimal, essais de phase III. D'après (Toth, 2013). CAD= sujets souffrant de maladie coronarienne.

2. Inhibiteurs de PCSK9 :

La PCSK9 ou proprotéine convertase subtilisine/kexine de type 9 régule les niveaux de LDL-C circulant en accélérant la dégradation hépatique du récepteur au LDL (LDLR). Le mécanisme exact n'est pas clairement établi mais PCSK9 pourrait interagir avec le domaine EGF-A du récepteur au LDL pour former un complexe qui est ensuite internalisé dans des endosomes *via* des puits recouverts de clathrine. Dans l'environnement acide de l'endosome, l'affinité de PCSK9 pour le LDLR augmente ce qui va ralentir le recyclage du LDLR à la surface cellulaire et promeut sa dégradation par des hydrolases lysosomales (Poirier & Mayer, 2013). Il existe une relation directe entre l'extension des lésions d'athérosclérose et le niveau d'expression de PCSK9 dans des modèles murins puisque sa surexpression est proathérogène alors que la délétion de ce gène est antiathérogène chez des souris soumises à un régime occidental que ce soit chez des souris C57Bl/6 ou apoE knock-out (KO) (Denis *et al*, 2012). L'identification de cette cible pharmacologique a par ailleurs été mise en évidence suite à des études génétiques effectuées chez l'homme. En effet, en 2003, une étude impliquant notamment 23 familles françaises a montré le rôle que jouent des mutations de *PCSK9* dans l'hypercholestérolémie familiale chez des sujets ne présentant pas de mutation des gènes codants le récepteur aux LDL ou l'apolipoprotéine B (Abifadel *et al.*, 2003). Depuis, plus de 53 mutations non synonymes et 17 mutations synonymes ont été découvertes dans ce gène. Les mutations gains de fonction sont en particulier associées à une hypercholestérolémie par diminution d'expression du récepteur

aux LDL alors que les mutations pertes de fonctions sont associées à une diminution des taux plasmatiques de LDL-C mais également à une diminution du risque coronarien. Ces mutations se distribuent dans divers domaines de PCSK9 sans pour autant qu'il soit possible de prédire leur importance fonctionnelle (Abifadel *et al.*, 2009). Cohen *et al.* (Cohen, Boerwinkle, Mosley, & Hobbs, 2006) ont en particulier montré en 2006 que 2.6% des sujets noirs et 3.2% des sujets blancs étudiés (plus de 12800 sujets au total) possédaient des mutations non sens de *PCSK9* qui étaient associées à une baisse du taux de LDL-C de 28% et 15% respectivement mais aussi à une baisse du risque coronarien dans ces deux populations de 88% chez les sujets noirs et 47% chez les sujets blancs. Différents types d'inhibiteurs ont donc été synthétisés afin d'augmenter la clairance de ces lipoprotéines de basse densité : ASO, anticorps, petits peptides empêchant l'interaction entre le LDLR et PCSK9 et petits ARN interférents (siRNA). Les anticorps monoclonaux sont les plus avancées sur le plan des essais cliniques avec **AMG-145** (Amgen) et **SAR236553/REGN727** (Sanofi et Regeneron Pharmaceutical Inc) qui ont montré leur efficacité dans des essais de phase II. En particulier, des administrations sous-cutanées de 140-150mg toutes les deux semaines montrent des efficacités similaires en matière de réduction du LDL-C, que ce soit en monothérapie ou en ajout aux statines. Ces deux composés réduisent ainsi les taux de LDL-C en dessous du seuil optimal de 0.7g/L chez la grande majorité des patients souffrant d'hypercholestérolémie familiale hétérozygote (Petrides *et al.*, 2013).

3. Inhibiteurs de MTP :

La MTP ou protéine microsomale de transfert des triglycérides participe à la formation des chylomicrons (dans l'entérocyte) et des VLDL (dans l'hépatocyte) en transférant les triglycérides à l'apoB naissante (T. R. Joy, 2012). Son inhibition est donc associée à une diminution de synthèse des chylomicrons, des VLDL et par conséquent des LDL. Plusieurs inhibiteurs ont vu le jour et c'est le **lomitapide** (Aegerion) qui est la molécule la plus avancée dans son développement. Une étude de phase III a récemment montré son efficacité avec une réduction des taux de LDL-C de 50% au bout de 26 semaines de traitement (la valeur moyenne est passée de 8.7 mmol/L à 4.3 mmol/L) (Cuchel *et al.*, 2013). Elle est déjà commercialisée aux Etats-Unis dans le cadre de l'hypercholestérolémie familiale malgré de nombreux effets indésirables (gastro-intestinaux, stéatose hépatique) (A. C. Goldberg, 2013).

b. Hypolipémiants : les fibrates

Utilisés en France chez près d'un patient sur deux dans les années 1996-1997, les fibrates ont vu leur prescription baisser durant les années 2000 pour représenter en 2007 17% des anti-lipémiqes prescrits, loin derrière les statines qui comptaient pour 72% de la prescription (Ferrières *et al*, 2009). Bien qu'en recul, ils restent un atout majeur chez les patients hypertriglycéridémiques puisque leur effet passe par une diminution plasmatique des taux de triglycérides et une augmentation des taux de HDL-cholestérol. Le mécanisme d'action de cette classe thérapeutique est maintenant mieux cerné puisqu'il passe par l'activation des récepteurs nucléaires PPAR α (récepteurs exprimés préférentiellement dans les tissus qui métabolisent de grandes quantités d'acides gras tels que le foie, le rein, le cœur et les muscles). Les fibrates agissent *via* l'activation de ces récepteurs mais aussi par l'inhibition de leur ubiquitinylation ce qui permet de les stabiliser. Ils restent alors plus longtemps dans les cellules ce qui permet d'augmenter l'expression des gènes cibles du PPAR α (Luc, 2002).

Parmi ces gènes cibles, figurent les gènes codant :

- **la lipoprotéine lipase (LPL)** : l'augmentation de son expression permet une hydrolyse accrue des triglycérides, des chylomicrons et des VLDL au niveau vasculaire.

- **l'apoC-III** : l'inhibition de cette apoprotéine présente en surface des VLDL et qui inhibe la lipoprotéine lipase permet de lever l'inhibition de clairance des VLDL.

→ Les modulations de transcription de ces deux gènes permettent d'expliquer la diminution de l'hypertriglycéridémie.

- **les apoA-I et apoA-II** (apolipoprotéines majeures des particules HDL) : stimulation de leur expression.

- **L'Adenosine Triphosphate Binding Cassette A1 transporter (ABCA1)** : transporteur qui efflue le cholestérol intracellulaire vers le milieu extérieur effectuant ainsi la primo-lipidation de l'apoA-I. Ce transporteur appartient à la famille des ABC transporteurs qui est la plus grande famille connue de transporteurs membranaires (Oram & Heinecke, 2005). Chaque membre utilise l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP pour transporter les

métabolites à travers la membrane. Son expression a été trouvée augmentée dans des cellules HepG2 (cellules d'hépatocarcinome en culture) et d'hépatocytes primaires de souris après stimulation de PPAR α (Hossain, Tsujita, Gonzalez, & Yokoyama, 2008) ce qui permettrait d'augmenter l'efflux du cholestérol vers les particules HDL.

- **la protéine de transfert des phospholipides (PLTP pour PhosphoLipid Transfer Protein)** : l'augmentation significative de l'activité de cette protéine permet un remodelage des particules HDL circulantes avec l'apparition de volumineuses α -HDL (résultat de transferts avec les lipoprotéines riches en triglycérides) et de petites pré- β HDL (résultat de la fusion de deux HDL-3 libérant une apo A-I pauvrement lipidée) (Bouly *et al*, 2001).

D'autres gènes sont aussi trouvés modulés *via* PPAR α , ceux-ci sont impliqués dans la β -oxydation des acides gras, dans l'adhésion des monocytes à l'endothélium ou encore sont le reflet de l'inflammation (tableau 7). Les modulations de ces gènes sont donc le reflet du potentiel pléiotropique de ces molécules.

Gène cible	Fonction de la protéine codée	Expression du gène
Acyl CoA synthétase	Activation des acides gras	Augmentation
Fatty acid binding protein	Capture des acides gras cellulaires	Augmentation
Voie de la β -oxydation	Oxydation des acides gras	Augmentation
Acétyl CoA carboxylase	Synthèse des acides gras	Diminution
Fibrinogène	Formation d'un caillot	Diminution
Protéine C réactive	Protéine de la phase aiguë de l'inflammation	Diminution
Interleukine 6	Cytokine de la phase aiguë de l'inflammation	Diminution
Cyclooxygénase-2	Métabolisme des acides gras	Diminution
VCAM-1	Adhésion cellulaire	Diminution

Tableau 7 : gènes régulés par PPAR α sous l'action des fibrates. D'après (Goldenberg, Benderly, & Goldbourt, 2008).

Il est à noter que tous les fibrates sont uniquement des agonistes de PPAR α excepté le bésafibrate qui est un activateur des trois types de PPAR (α , β/δ et γ). Chaque type de PPAR possède des localisations et des fonctions bien précises. PPAR α est essentiellement présent dans les tissus qui métabolisent de grandes quantités d'acides gras *via* la β -oxydation comme le foie ; PPAR γ est principalement retrouvé dans les adipocytes et le muscle et est impliqué dans le contrôle de la différenciation adipocytaire, le stockage lipidique et l'inflammation ; enfin, PPAR β/δ possède une expression plus ubiquitaire (muscles, adipocytes, macrophage) et intervient dans l'oxydation des acides gras. Finalement, quel que soit leur mode d'action, les fibrates sont responsables de manière équivalente d'augmentation des taux de HDL-cholestérol et de diminution des taux de triglycérides (cf. tableau 8). Il reste toutefois intéressant de voir que le fénofibrate peut être

associé à une diminution du taux de HDL-cholestérol. Une étude irlandaise de 2009 a montré que sur quatre-vingt-quatorze patients traités par fénofibrate, 46% avaient une diminution significative des taux de HDL-cholestérol au bout de huit à douze semaines de traitement (dont neuf qui avaient une diminution supérieure à 50%). L'explication avancée par les auteurs serait une cause génétique dans cette population. Les auteurs rappellent par ailleurs que ces diminutions ont déjà été observées avec d'autres fibrates et que cela pourrait être un effet de classe (Magee & Sharpe, 2009). Plus récemment, de nouvelles études ont été développées afin de trouver des agonistes plus puissants que les fibrates actuellement utilisés afin d'obtenir de plus grandes augmentations des concentrations plasmatiques en HDL-cholestérol. Parmi ces nouvelles molécules, le CP-778,875 a déjà été testé chez l'homme dans des études de sécurité et d'efficacité (Terra *et al*, 2008). Testé à différentes doses, seule la dose de 2 mg a permis une augmentation significative du taux de HDL-cholestérol (plus 14,5% en six semaines par rapport à la valeur de base). Dénué d'effets indésirables graves, des augmentations dose-dépendantes du taux d'homocystéine ont été observées sans que l'on en connaisse les conséquences cliniques.

Fibrates (DCI)	Nombre d'essais	Nombre de sujets	HDL-cholestérol	Nombre d'essais	Nombre de sujets	TG
Bézafibrate	12	5161	+ 11%	13	5177	- 30,70%
Ciprofibrate	2	91	+ 10%	2	91	- 45%
Fénofibrate	15	1457	+ 10,20%	15	1457	- 40,10%
Gemfibrozil	17	7461	+ 10,70%	16	7441	- 47,90%

Tableau 8 : augmentation des taux de HDL-cholestérol et de diminution des taux de triglycérides en fonction du fibrate utilisé. TG = triglycérides. D'après (Farnier, Bonnet, Bruckert, Ferrières, & Paillard, 2006).

De nombreuses études ont eu lieu afin de savoir si cette amélioration du profil lipidique était associée à une diminution significative des accidents cardio-vasculaires. Une récente méta-analyse publiée en 2009 a synthétisé les données de vingt études de plus de

cent patients et ayant plus de huit semaines de suivi (Abourbih *et al.*, 2009). Trois fibrates étaient concernés : le bézafibrate, le fénofibrate et le gemfibrozil et il a finalement été montré que l'ensemble des fibrates sont associés à une amélioration du profil lipoprotéique, une diminution significative du nombre d'IDM non mortel mais qu'il n'y a pas de différence pour la mortalité totale à la différence des statines. En pratique courante, les fibrates sont le plus souvent utilisés en monothérapie chez les patients intolérants aux statines ou hypertriglycéridémiques ainsi qu'en adjonction aux statines afin de potentialiser leur effet. D'autres essais ont de plus montré, dans des populations spécifiques, qu'il n'y avait pas de preuve du bénéfice à ajouter des fibrates à des statines. C'est le cas de l'essai ACCORD (Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes) qui a mis en avant l'absence de bénéfice à ajouter du fénofibrate à une statine en routine des patients diabétiques de type 2 (Ginsberg, 2011). Chez 5518 hommes et femmes diabétiques de type 2, l'ajout de fénofibrate en plus d'une statine n'a pas permis de diminuer le délai d'apparition d'infarctus du myocarde non fatal, d'accident vasculaire coronarien ischémique ainsi que la mortalité cardio-vasculaire. L'essai FIELD (Fenofibrate Intervention and Event Lowering in Diabetes) avait également abouti à des conclusions similaires puisque la prise de fénofibrate pris par des diabétiques de type 2 n'a pas été associée à une diminution du nombre de décès liés à la maladie coronarienne ou à des infarctus du myocarde (le nombre d'évènements coronariens était toutefois diminué) (Keech *et al.*, 2005)(Keech *et al.*, 2005). Les résultats de ces différentes études ne s'accordent donc tous pas et mettent en avant l'absence de preuve irréfutable du bénéfice clinique à utiliser des fibrates.

CHAPITRE II :

LES LIPOPROTÉINES DE HAUTE DENSITÉ (HDL)

A) Classification et structure :

a. Classification :

Les particules HDL sont hétérogènes aussi bien en taille qu'en composition. D'une densité comprise entre **1.063 et 1.21 g/mL**, c'est un groupe formé de particules dont la taille varie entre 7 et 12nm et qui diffèrent également par leur mobilité électrophorétique. Cette diversité est le reflet d'un remodelage plasmatique permanent : sous forme naissante, elles sont discoïdales, de petite taille (≤ 8 nm) et pauvres en lipides mais au fur et à mesure de leur enrichissement en lipides et cholestérol, elles deviennent sphériques. Il existe différentes techniques pour séparer les HDL que ce soit en fonction de leurs propriétés physico-chimiques ou de leur composition. La plus ancienne technique est l'**ultracentrifugation séquentielle** qui permet de séparer les **HDL-2** (larges, riches en lipides) (densité : 1.063-1.125g/mL) des **HDL-3** (petites et riches en protéines) (densité : 1.125-1.21g/mL). Ces deux classes peuvent ensuite être sous-fractionnées par électrophorèse sur gel non dénaturant de polyacrylamide en cinq sous-populations de taille décroissante ou par **ultracentrifugation isopycnique** (gradient de densité) : HDL2b, HDL2a, HDL3a, HDL3b et HDL3c (figure 7).

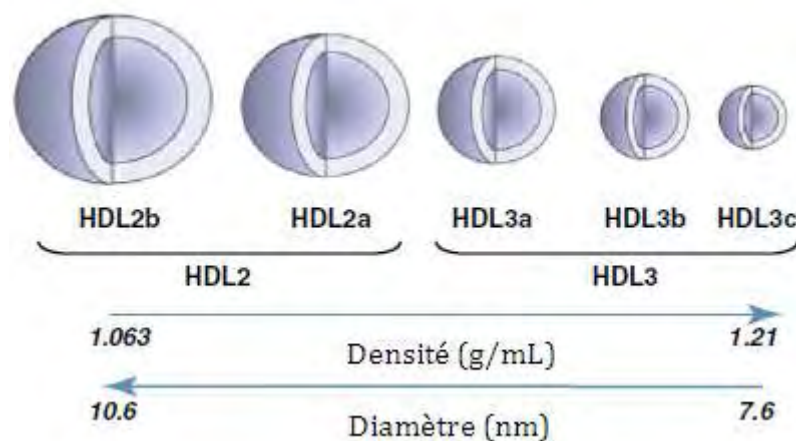


Figure 7 : Hétérogénéité des particules HDL, classification des sous-populations de HDL en fonction de leur densité et de leur taille. D'après (Camont, Chapman, & Kontush, 2011).

L'électrophorèse en deux dimensions permet également de séparer les HDL en fonction de leur taille et de leur charge. Parmi les sous-fractions séparées, nous retrouvons (Rosenson *et al*, 2011):

- Le précurseur discoïdal de mobilité pré- β (**HDL pré β -1**, environ 5.6 nm) qui contient de l'apoA-I et des phospholipides.
- Les très petites HDL discoïdales de mobilité α (**HDL α -4**, environ 7.4nm) qui contiennent de l'apoA-I, des phospholipides et du cholestérol libre.
- Les petites HDL sphériques de mobilité α (**HDL α -3**, environ 8nm) qui contiennent des apoA-I, apo A-II, des phospholipides, du cholestérol libre, du cholestérol ester et des triglycérides.
- Les HDL sphériques de taille moyenne de mobilité α (**HDL α -2**, environ 9.2nm), de même composition que les HDL α -3.
- Les larges HDL sphériques de mobilité α (**HDL α -1**) de même constitution que les HDL α -2 et α -3 sauf qu'il n'y a quasiment pas d'apoA-II.
- De larges HDL migrant en pré- β connues sous le nom de **HDL pré β -2**.

Une représentation schématique en est donnée figure 8 ci-dessous.

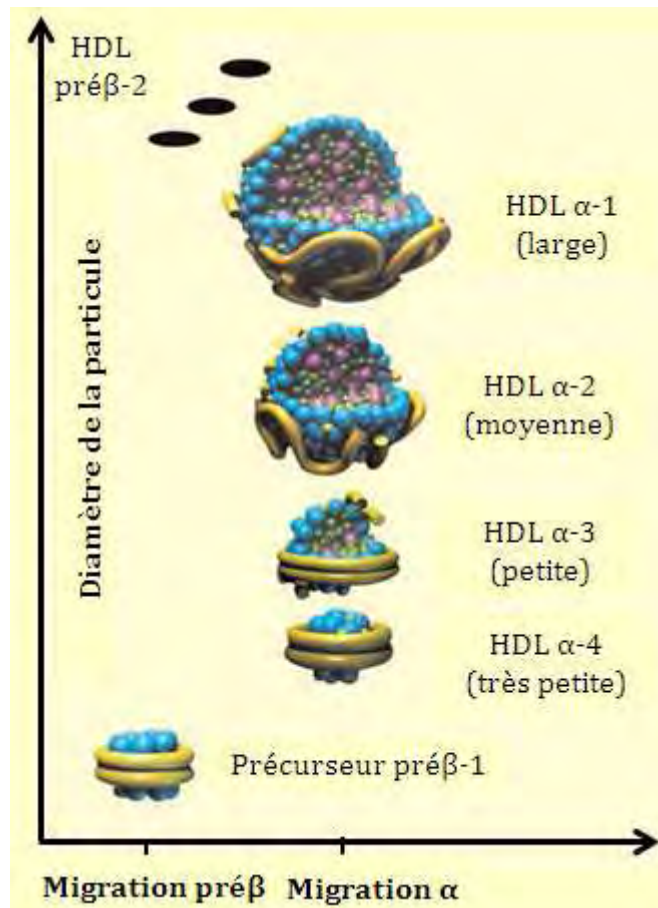


Figure 8 : Diversité des différentes sous-fractions de HDL en électrophorèse deux dimensions. D'après (Schaefer, Santos, & Asztalos, 2010).

Au final, une proposition simplifiée de classification pourrait être la suivante :

	HDL très large (HDL2b)	HDL large (HDL2a)	HDL moyenne (HDL3a)	HDL petite (HDL3b)	HDL très petite (HDL3c)
Densité (g/mL)	1,063-1,087	1,088-1,110	1,110-1,129	1,129-1,154	1,154-1,21
Taille (nm)	12,9-9,7	9,7-8,8	8,8-8,2	8,2-7,8	7,8-7,2
Migration électrophorétique	α-1	α-2	α-3	α-4	pré-β

Tableau 9 : Classification des HDL en fonction de leurs propriétés physiques. D'après (Rosenson *et al*, 2011).

b. Composition :

Chacune de ces sous-fractions est caractérisée par un contenu différent en protéines et lipides (tableau 10). Les principales protéines transportées par les HDL sont les apolipoprotéines. Comme nous le verrons par la suite, ces protéines amphipathiques sont en partie responsables des nombreux effets bénéfiques des HDL.

	HDL 2b	HDL 2a	HDL 3a	HDL 3b	HDL 3c
Protéines (%)	35	40	45	55	65
Lipides (%)	65	60	55	45	35
Masse moléculaire moyenne (kDa)	410	400	360	200	160
	mol/mol HDL				
Apolipoprotéines					
apoA-I	4-5	4	3-4	3	2-3
autres	≤2	≤2	≤2	1	≤1
Lipides de surface					
Phospholipides	130	140	120	45	25
Cholestérol libre	70	40	25	15	10
Cœur lipidique					
Esters de cholestérol	180	160	140	70	40
Triglycérides	30	20	15	10	5

Tableau 10 : propriétés physico-chimiques des différentes sous-fractions de HDL chez des sujets normolipémiques sains. D'après (Kontush & Chapman, 2006).

i. Protéome :

Quel que soit leur sous-groupe, les HDL diffèrent des autres lipoprotéines par leur contenu élevé en protéines (plus de 30% du poids total). L'apoA-I constitue environ 70% du contenu protéique et est présente sur toutes les HDL. Loin derrière, il y a l'apoA-II qui compte pour environ 20% du contenu lipoprotéique et qui est présente dans environ deux-tiers des lipoprotéines. Moins de 10% des protéines restantes sont constituées de diverses apoprotéines (apoE, apoA-IV, apoA-V, apoJ, apoC-I, apoC-II, apoC-III, apoG, apoH, apoL et

apoSAA). Chacune de ces apoprotéines possède des fonctions bien particulières (tableau 11 ci-après).

Nom (masse moléculaire en kDa)	Distribution	Fonctions
apoA-I (28)	HDL, chylomicrons	Structurale, activation de la LCAT, efflux de cholestérol
apoA-II (17)	HDL	Structurale, activation/inhibition de la lipase hépatique, efflux de cholestérol
apoA-IV (46)	Chylomicrons, HDL	TRC, activation de la LCAT, métabolisme des lipoprotéines riches en TG
apoA-V (39)	HDL	Métabolisme des lipoprotéines riches en TG, stimulation de la LPL
apoC-I (6,5)	Chylomicrons, VLDL, HDL	Inhibition de la CETP, activation de la LCAT, inhibition de la liaison aux LDLR, LRP et VLDLR
apoC-II (8,5)	Chylomicrons, VLDL, HDL	Activation de la LPL
apoC-III (8,7)	Chylomicrons, VLDL, HDL	Inhibition de la LPL, inhibition de la captation hépatique des lipoprotéines riches en TG
apoE (34)	Chylomicrons, VLDL, IDL, HDL	Ligand des récepteurs LDLR et LRP
apoG (72)	HDL	?
apoH (β2 glycoprotéine I) (54)	HDL	Cible des auto-anticorps du syndrome des antiphospholipides
apoJ (clusterine) (80)	HDL	Anti-inflammatoire
apoL (44)	HDL	Lyse des trypanosomes
apoSAA (12,5)	Chylomicrons, HDL	Phase aiguë de l'inflammation

Tableau 11 : distribution et fonction de chaque apoprotéine trouvée dans les HDL. LCAT = Lécithine Cholestérol Acyl Transférase, CETP = Cholesterol Ester Transfer Protein, LDLR = récepteur aux LDL, LRP = LDL Related Protein, TG = triglycérides, TRC : Transport Retour du Cholestérol, VLDLR = récepteur aux VLDL, LPL = Lipoprotéine Lipase (d'après la page 61 de (Toussaint *et al*, 2003).

Au-delà de ces protéines spécifiques des lipoprotéines, il y en a d'autres qui sont également transportées par les HDL. C'est le cas d'enzymes telles que la paraoxonase (**PON1**), la platelet-activating factor acétylhydrolase (**PAF-AH**), la lécithine cholestérol acyl transférase (**LCAT**) ou la glutathion peroxydase (**GSPx**) (Kontush & Chapman, 2006). Les HDL transportent également des protéines impliquées dans le métabolisme lipidique comme les protéines de transfert des esters de cholestérol (**CETP**) et de phospholipides (**PLTP**).

Depuis quelques années, les avancées de la spectrométrie de masse ont également permis de montrer que les HDL sont capables de transporter de nombreuses autres protéines. Selon la méthode utilisée pour isoler les HDL, plus de 85 protéines ont été identifiées dans au moins trois études indépendantes. Ce sont des membres de la voie du complément, des inhibiteurs de protéase impliqués dans l'hémostase, des protéines de la phase aigüe de l'inflammation, des protéines impliquées dans l'immunité et même des protéines de liaison aux métaux (tableau 12) (Shah et al, 2013).

Métabolisme lipidique et transport	Hémostase	Réponse immune	Liaison aux métaux	Transport des vitamines
apoA-I, apoA-II, apoA-IV, apoD, apoE, apoF, apoC-I, apoC-II, apoC-III, apoC-IV, apoO, apo(a), LCAT, PLTP, CETP, PAF-AH, SAA4, PON1, PON3, albumine, transthyrétine, apoM, apoB, apoL-I	Fibrinogènes α , β et γ , apoH, α -2 macroglobuline	Protéine basique plaquettaire, vitronectine, protéine liée à l'haptoglobine, chaîne C des Ig α -1, γ -1, κ -1, λ -1, serpine G1, facteur plaquettaire 4, apoL-1	céruloplasmine, hémopexine, sérotransferrine	protéine de liaison à la vitamine D, protéine de liaison au rétinol (RBP)
apoA-IV, α -1-glycoprotéines acides 1 et 2, SAA 1 et 2	Prothrombine, kininogène, kalistatine	apoA-IV, protéine de liaison au LBP, α -2 antiplasmine	α -1 antitrypsine, α -1 anti-chymotrypsine, fibronectine, α -2 HS glycoprotéine	Phase aigüe de l'inflammation
	ATIII, plasminogène, serpins G1 et D1, kallikréine	α -2 antiplasmine	α -1 antitrypsine, co-facteur 2 de l'héparine, α -1 antichymotrypsine, serpine F1	Protéolyse
apoJ	fraction C9 du complément	Fractions 1S, C2, 4B, B, H et C3 du complément, apoJ		Complément, immunité

Tableau 12 : Relations fonctionnelles des protéines transportées par les HDL. D'après (Shah et al, 2013).

ii. Lipidome :

Classiquement, les lipides transportés par les HDL sont divisés en deux catégories : d'un côté les lipides hydrophobes (esters de cholestérol et triglycérides) transportés dans le cœur de la lipoprotéine et de l'autre côté, les lipides amphipathiques (cholestérol libre et phospholipides) localisés à la surface. Parmi ces lipides certains peuvent être transformés en puissante molécule bioactive. Par exemple, la phosphatidylcholine qui est très fréquente dans les HDL donne après hydrolyse la lysophosphatidylcholine qui est hautement réactive et potentiellement dangereuse (Vickers & Remaley, 2013). En effet, et bien que le mécanisme physiopathologique précis ne soit pas expliqué, la lysophosphatidylcholine interfère sur diverses fonctions dans de nombreux types cellulaires. En particulier, elle altère la relaxation de l'endothélium en réponse aux facteurs vaso-relaxants et module la réponse contractile des cellules musculaires lisses (Matsumoto, Kobayashi, & Kamata, 2007). Ce contenu en lipides varie suivant les sous-classes de HDL ce qui témoigne du remodelage dynamique permanent. Par exemple, le contenu relatif en sphingomyéline diminue progressivement des HDL2b (12.8%) aux HDL3c (6.2%), il en est de même pour le cholestérol libre (Rosenson *et al*, 2011). Parmi les **lipides bioactifs**, figure notamment la sphingosine-1-phosphate qui participe à la survie endothéliale et qui est retrouvée préférentiellement dans les HDL3.

iii. Métabolome :

De nombreuses molécules hydrophobes peuvent être transportées par les HDL (tableau 13), c'est le cas des **vitamines liposolubles** comme la vitamine E (α -tocophérol), la vitamine D, la vitamine A (rétinol) ou ses précurseurs, les caroténoïdes. Certaines **hormones** et **stéroïdes** peuvent également être véhiculées par cette lipoprotéine telle que l'hormone T4 (thyroxine) ou des hormones estérifiées (pregnénolone, œstrogène, déhydroépiandrostérone). Leur devenir est toutefois moins clair puisque ces hormones pourraient agir comme régulateurs transcriptionnels ou pourraient servir de précurseurs pour la synthèse cellulaire des stéroïdes (Vickers & Remaley, 2013). La plupart des **acides biliaires** sont libres ou liés à l'albumine dans la circulation ; cependant, ils sont également retrouvés dans les lipoprotéines. Dans des conditions où les concentrations en acides biliaires sanguins augmentent (type cholestase), leur affinité pour les différentes classes de lipoprotéines devient même équivalente à celle pour l'albumine (Ceryak, Bouscarel, &

Fromm, 1993). Les acides biliaires conjugués sont les plus représentés dans les HDL et chez des sujets normolipémiques, 11% des acides biliaires de la circulation sont retrouvés associés aux HDL (84% à des protéines issues de sérum déplété en lipoprotéines et 5% aux LDL/VLDL) (Steiner *et al*, 2012).

Type de molécule	Composé	Fonction possible	Tissu ou type cellulaire
vitamine	vitamine E (α -tocophérol)	anti-oxydant essentiel	cellules épithéliales, endothéliales
hormone thyroïdienne	thyroxine (T4)	développement, métabolisme	nombreux
hormones stéroïdes	œstrogène	activation récepteurs nucléaires, précurseur synthèse stéroïdes	ovaires, surrénales, hépatocytes
	pregnénolone	activation récepteurs nucléaires, précurseur synthèse stéroïdes	ovaires, surrénales, hépatocytes
	déhydroépiandrostérone	activation récepteurs nucléaires, précurseur synthèse stéroïdes	ovaires, surrénales, hépatocytes
acides biliaires	acide chénodésoxycholique	activation de signaux, cytotoxicité, tumorigénèse, solubilisation des lipides alimentaires	cellules périphériques
	acide cholique		
	acide lithocholique		
	acide glycochenodeoxycholique		
caroténoïdes	β -carotène	anti-oxydant, pigment rétinien, peau, système immunitaire	rétine, macula, peau, os
	α -carotène	anti-oxydant, pigment rétinien, peau, système immunitaire	rétine, macula, peau, os
	lycopène	anti-oxydant	poumons, estomac, prostate
	lutéine	anti-oxydant, pigment pour la rétine	rétine, macula, peau, os
	cryptoxanthine	anti-oxydant, suppresseur de tumeur	poumons
métabolites	ubiquinone	prévention insuffisance cardiaque, cancer, hypertension, métabolisme énergétique	cardiomyocytes, cellules vasculaires
	acide hénicosanoïque	acide gras saturé	nombreux
	pentitol	métabolisme des sucres	fibroblastes, érythrocytes
	acide oxalique	agent réducteur, chélateur	nombreux

Table 13 : Exemples de petites molécules transportées par les HDL. D'après (Vickers & Remaley, 2013).

iv. Transcriptome :

Parmi les ARN non codants, certains peuvent moduler l'expression de gènes. Parmi eux, on retrouve des ARN de moins de 200 nucléotides qui facilitent le remodelage de la chromatine (long noncoding RNA ou lncRNA), des petits ARN d'environ 150 nucléotides intervenant lors de l'épissage (small nuclear RNA ou snRNA) et enfin, des ARN cytoplasmiques d'environ 22 nucléotides qui déstabilisent l'ARN et/ou inhibent la traduction protéique (**microRNA** ou **miRNA**) (Ouimet & Moore, 2013). C'est cette dernière classe qui nous intéresse particulièrement. Le génome humain code plus de 1000 miRNA qui peuvent se lier partiellement et de façon complémentaire, majoritairement aux régions 3'UTR des ARNm cibles. Un seul miRNA peut alors réguler de nombreux gènes faisant de ces miRNA de puissants régulateurs biologiques. De façon intéressante, ils ne sont pas retrouvés uniquement dans le milieu intracellulaire puisqu'ils peuvent être détectés dans de nombreux fluides de l'organisme (sérum, plasma, urine...) montrant ainsi qu'en dépit de la forte activité RNase, les miRNA extracellulaires sont très stables et bien protégés de toute digestion. En effet, plus de 90% des miRNA extracellulaires sont empaquetés avec des protéines (notamment les HDL ou Ago2) alors que les 10% restants sont contenus dans des particules telles que des exosomes, microvésicules ou corps apoptotiques (Zhu & Fan, 2011). Bien que les LDL puissent en transporter, il y en a plus dans les HDL et ce ne sont d'ailleurs pas les mêmes. Parmi les miRNA les plus fréquents, on notera la présence de miR-223, miR-126 et miR-92a ((Vickers, Palmisano, Shoucri, Shamburek, & Remaley, 2011; Wagner *et al*, 2013)). Toutefois, le miR-223 lié aux HDL (et qui est retrouvé dans ces deux études) ne compte que pour 8% de l'ensemble des miRNA circulants (Wagner *et al*, 2013). Il a été très étudié et serait impliqué dans le métabolisme glucidique des cardiomyocytes, la granulopoïèse ou la différenciation ostéoclastique (Vickers *et al*, 2011) . Les sujets souffrant d'hypercholestérolémie familiale surexpriment par ailleurs ce miRNA par rapport aux sujets sains. Et alors que les profils de miRNAs associés aux HDL sont différents entre sujets sains et sujets souffrant d'hypercholestérolémie familiale (Vickers *et al*, 2011), les patients souffrant de maladie coronarienne présentent un profil peu perturbé par rapport à des sujets contrôles (Wagner *et al*, 2013).

B) Métabolisme :

a. Biosynthèse et remodelage plasmatique :

i. Mécanisme général :

La biosynthèse des HDL est complexe et débute par la production d'apoA-I par le foie et l'intestin ainsi que par la production d'apoA-II par le foie. Nouvellement synthétisées, ces apolipoprotéines ont la capacité d'acquérir des lipides et en particulier de se charger en phospholipides et en cholestérol libre après efflux cellulaire de ceux-ci par les ATP Binding Cassette transporters A1 et G1 (ABCA1 et ABCG1) qui permettent un efflux actif (après hydrolyse d'ATP) et par le récepteur CLA-1 ou son homologue murin le scavenger récepteur classe B type I (SR-BI) qui permet un efflux passif (ne nécessitant pas d'ATP). ABCA1 est responsable de l'efflux de phospholipides et de cholestérol vers l'apoA-I libre qui, suite à cette primolipidation, devient un meilleur accepteur de cholestérol que l'apoA-I libre. Fondamentale dans la formation des pré- β HDL, la lipidation d'apoA-I par ABCA1 constitue l'étape limitante dans le maintien des concentrations plasmatiques d'HDL (Timmins *et al*, 2005)(Lee & Parks, 2005). Une fois primolipidée, l'apoA-I capte le cholestérol cellulaire excédentaire par l'intermédiaire d'ABCG1. Il est à noter qu'ABCG1 ne peut lipider que les HDL-2 et HDL-3 mais absolument pas l'apoA-I libre (Cavelier, Lorenzi, Rohrer, & von Eckardstein, 2006). Ces pré- β HDL peuvent également être issues du remodelage des chylomicrons et des VLDL par hydrolyse de leurs triglycérides par différentes lipases qui permettent leur formation après élimination des phospholipides et des apolipoprotéines de surface. La maturation des HDL est elle-même source de pré- β HDL puisque la fusion de deux molécules d'HDL-3 par la PLTP conduit à la formation d'une particule HDL plus large avec perte d'une apoA-I faiblement lipidée qui est capable de repartir chercher le cholestérol cellulaire (Huuskonen, Olkkonen, Jauhiainen, & Ehnholm, 2001). Une fois que le cholestérol libre cellulaire a été capté, la LCAT vient l'estérifier et le cholestérol estérifié migre dans le cœur lipidique de la lipoprotéine ce qui permet de créer un gradient de cholestérol libre des cellules vers les HDL. En outre, le cholestérol estérifié peut être transféré aux VLDL et aux LDL par la CETP en échange de triglycérides. Une fois ce remodelage plasmatique effectué, les HDL sont ensuite prises en charge par différentes lipases avant d'être métabolisées par le foie. Un résumé de la formation des HDL est proposé figure 9.

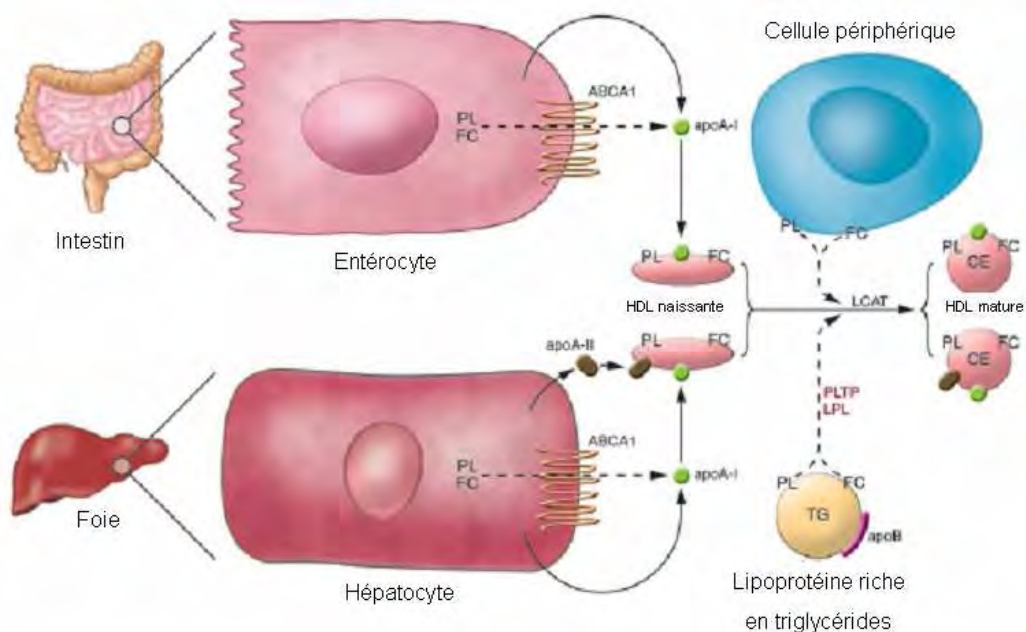


Figure 9 : Biosynthèse des HDL. Les entérocytes et les hépatocytes synthétisent les apoA-I et apoA-II pauvres en lipides qui vont pouvoir se lipider *via* ABCA1 et ABCG1 pour former des HDL naissantes. Ces lipoprotéines se chargent alors en cholestérol provenant des cellules périphériques et après remodelage plasmatique sous l'action des LCAT, CETP et PLTP, des HDL matures sont formées. D'après (Rader, 2006). CE : ester de cholestérol, FC : cholestérol libre, PL : phospholipides, TG : triglycérides.

ii. Les partenaires :

1. ApoA-I (NP_000030.1) :

Cette apolipoprotéine majeure des HDL est relativement abondante dans le plasma humain avec des concentrations variant de 1.1 à 2.1 g/L (valeurs de référence du laboratoire de biochimie Purpan, méthode néphélométrique). Elle est synthétisée par le foie et l'intestin mais aussi par le cœur (Baroukh *et al*, 2004) sous la forme d'une pré-pro-protéine de 267 acides aminés. Après clivage des 18 acides aminés N-terminaux, la pro-apolipoprotéine est sécrétée dans le sang et la lymphe. La maturation en apoA-I mature de 243 acides aminés se fait ensuite grâce au clivage du propeptide par la Bone Morphogenic Protein-1 (BMP-1) et le Procollagen C-Proteinase Enhancer-2 (PCPE2) (Sviridov, 2009). Elle est composée de répétitions de 22 et 11 acides aminés qui sont organisés en hélices- α amphipathiques (figure 10).

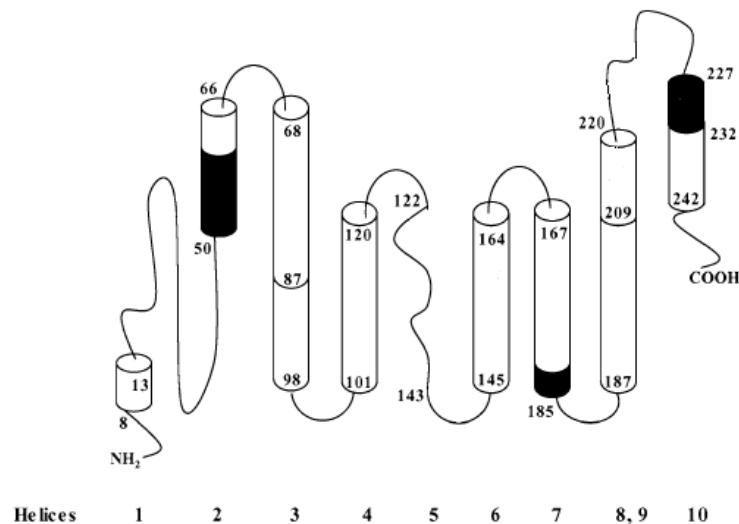


Figure 10 : structure secondaire de l'apoA-I. L'apoA-I est une molécule composée d'une répétition de différentes unités formant des hélices- α amphipathiques. D'après (VI Zannis, Chroni, & Krieger, 2006).

Chaque hélice présente deux faces : une face hydrophobe qui permet la liaison aux phospholipides de la HDL et une face contenant des acides aminés chargés négativement tournée vers l'extérieur. La conformation classiquement retenue de l'apoA-I dans la pré- β HDL est le modèle de la ceinture où deux molécules d'apoA-I sont positionnées de façon antiparallèle autour des lipides. Outre qu'elle est essentielle à la captation du cholestérol cellulaire excédentaire, l'apoA-I joue le rôle de coactivateur de la LCAT et est indispensable à la captation du cholestérol par le foie puisque sa liaison avec la F_1 -ATPase active la voie d'endocytose de l'holoparticule HDL. Protéine principale des HDL, son rôle est essentiel pour contrer le développement de l'athérosclérose. Des souris apoE KO, souris qui développent spontanément des plaques d'athérome lorsqu'elles sont soumises à un régime riche en graisse, ont été soumises à un transfert de gène d'apoA-I humaine. Les résultats ont montré que l'apoA-I permettait d'inhiber la progression de l'athérosclérose avec une diminution de la taille des stries lipidiques supérieure à 50% par rapport aux souris contrôles (Benoit *et al*, 1999). Elle permet également de retarder l'aggravation de lésions pré-existantes d'athérosclérose en diminuant leur contenu en macrophages et en augmentant le nombre ainsi qu'en stabilisant les cellules musculaires lisses (Rong *et al*, 2001).

2. ABCA1 (NP_005493.2) :

Cette glycoprotéine de 2261 acides aminés est un transporteur entier composé de deux unités similaires jointes de façon covalente. **ABCA1** possède 12 domaines transmembranaires et deux domaines de liaison intracellulaires à l'ATP qui sont essentiels au bon fonctionnement du transporteur. Bien que le mécanisme ne soit pas totalement clair, ABCA1 formerait des oligomères afin de créer un canal transmembranaire qui permettrait l'efflux de phospholipides puis de cholestérol vers l'apoA-I par un mécanisme demandant l'hydrolyse de l'ATP fixé dans les deux domaines intracellulaires de liaison (figure 11).

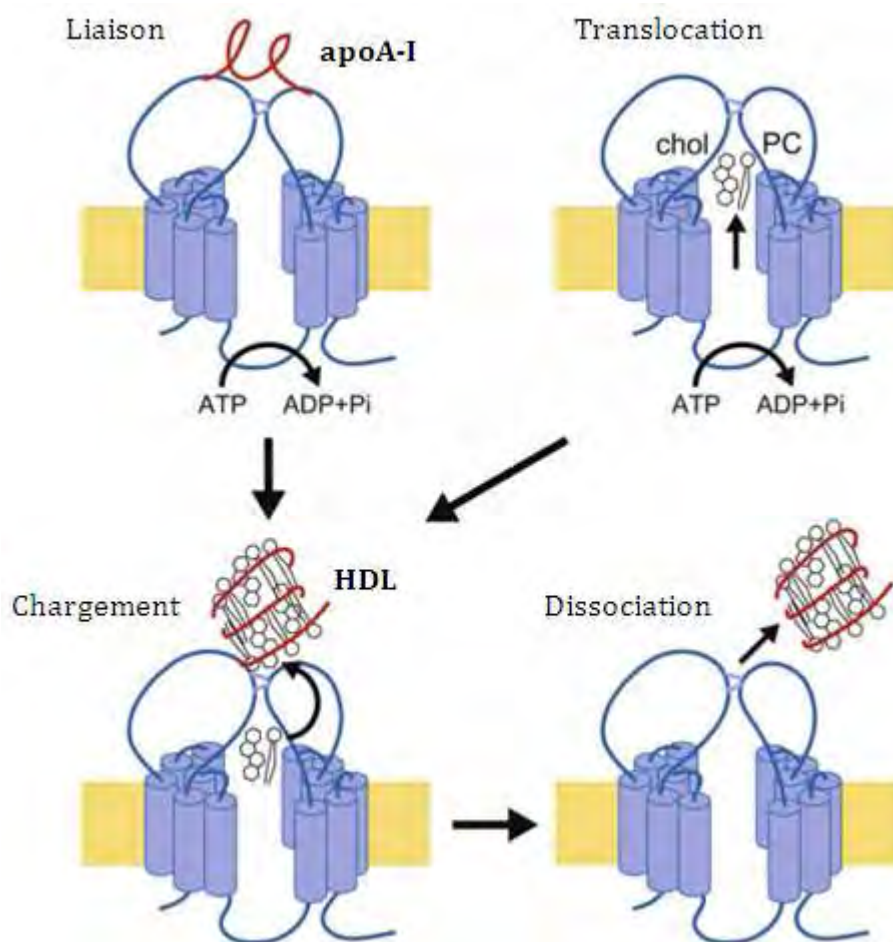


Figure 11 : Modèle en quatre étapes de la formation des HDL via ABCA1. La liaison de l'ATP et/ou son hydrolyse entraîne une modification conformationnelle des boucles extracellulaires d'ABCA1 sur lesquelles l'apoA-I peut directement se lier. Il y a ensuite une étape de translocation des lipides indépendante de l'apoA-I puis leur chargement sur l'apolipoprotéine. Enfin, l'étape de dissociation permet la libération de l'apoA-I lipidée. Dans ce modèle, la translocation des lipides peut être réalisée de façon séparée de la présence d'apoA-I. L'apoA-I lipidée est *a priori* responsable de changements conformationnels ce qui facilite la dissociation de l'ABC transporteur. D'après(Nagao, Kimura, Mastuo, & Ueda, 2010).

Bien qu'exprimés de façon ubiquitaire, ce sont les transporteurs ABCA1 du foie et de l'intestin qui sont responsables de la très grande majorité de la primo-lipidation de l'apoA-I : chez la souris, l'inactivation d'ABCA1 spécifiquement dans le foie ou l'intestin est responsable respectivement d'une chute de 80 et 30% des taux de HDL-C (Timmins *et al*, 2005) et (Liam R Brunham *et al*, 2006). De plus, l'apoA-I n'est pas la seule à se fixer sur ce transporteur, d'autres apolipoprotéines peuvent entrer en compétition avec elle, c'est le cas des apoA-II, C-I, C-II et C-III (Fitzgerald *et al*, 2004). Cette première réaction du transport retour du cholestérol est essentielle puisqu'il a été montré chez l'homme que des mutations du gène codant ABCA1 causent une absence de primo-lipidation avec des taux quasi-indétectables d'apoA-I et de HDL (la demi-vie de l'apoA-I est très courte quand elle n'est pas lipidée). C'est la maladie de Tangier que nous retrouverons plus loin dans ce manuscrit.

3. ABCG1 (AAL06598.1) :

Le transporteur **ABCG1** intervient lui dans un deuxième temps et permet l'efflux du cholestérol vers des apoprotéines déjà lipidées. Cette protéine est, contrairement à ABCA1, un hémitransporteur, c'est-à-dire qu'elle n'est composée que de six domaines transmembranaires avec un large domaine intra-cellulaire de liaison à l'ATP et elle n'est active que sous forme d'homodimère (figure 12).

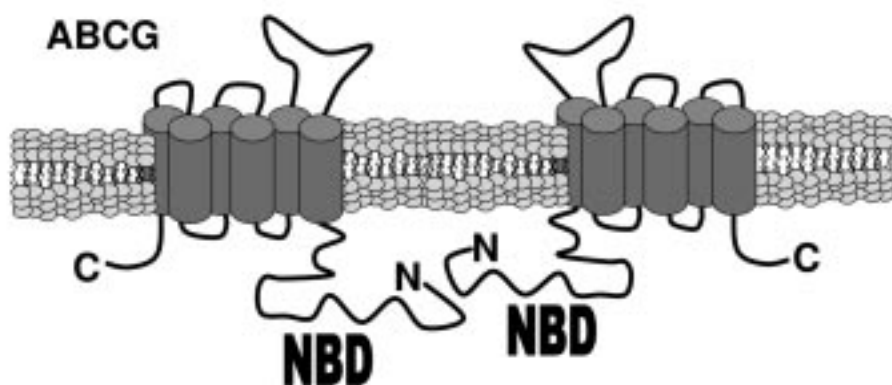


Figure 12 : modèle de structure des hémitransporteurs de la sous-famille des ABCG transporteurs, pour être fonctionnel ABCG1 doit s'homodimériser. NBD = domaine de liaison aux nucléotides. D'après (Oram & Vaughan, 2006).

A l'inverse d'ABCA1 qui peut transporter des phospholipides et d'autres composés lipophiles, ABCG1 transporte essentiellement du cholestérol (les phospholipides aussi mais en quantité beaucoup plus faible). Ce rôle synergique pourrait laisser penser que ce

transporteur a un rôle athéroprotecteur important. Pourtant, jusqu'à présent, les études n'ont rien montré de certain et Baldan *et al* (Baldán, Bojanic, & Edwards, 2009) ont mis en avant que la surexpression d'ABCG1 chez des souris *LDLR^{-/-}* et *apoE^{-/-}* n'a pas d'effet sur la taille des lésions d'athérosclérose. De même, les tailles des lésions chez des souris double KO pour *ABCA1* et *ABCG1* sont similaires à celles des souris KO pour *ABCA1*. Chez l'homme, aucune variation génétique n'a pour l'instant pu être reliée à une pathologie ce qui pourrait s'expliquer par le fait qu'ABCG1 influence peu les concentrations des lipides plasmatiques et ainsi, que les patients porteurs de mutations pour ce gène présenteraient très certainement des profils lipoprotéiques quasi normaux. Il reste donc à trouver quelle importance revêt ce transporteur dans la protection de l'athérosclérose.

4. CLA-1 / SR-BI :

CLA-1, glycoprotéine humaine de 509 acides aminés présente une homologie de séquence de 80% avec son homologue murin SR-BI (Calvo *et al*, 1997). Il est composé d'une large boucle extracellulaire pouvant être glycosylée ainsi que de deux petite queues intracellulaires N et C terminales (figure 13).

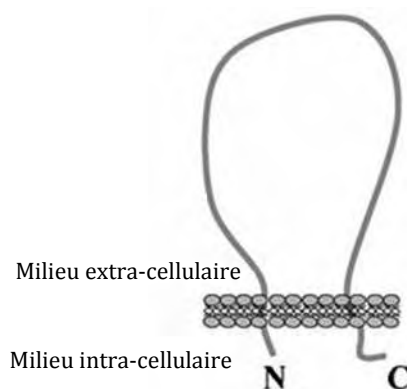


Figure 13 : structure de CLA-1 / SR-BI. D'après (Zannis *et al*, 2006).

Ce récepteur est localisé majoritairement dans les tissus où le métabolisme du cholestérol est important, dans le foie et les organes de synthèse des hormones stéroïdes (ovaires, testicules, placenta) (Calvo *et al*, 1997). Absent à la surface des monocytes, son expression est induite à la surface des macrophages au fur et à mesure de leur différenciation, les niveaux d'expression les plus forts étant retrouvés dans les macrophages

du noyau lipidique (Chinetti *et al*, 2000). Connu pour son rôle majeur dans la captation du cholestérol HDL, c'est également un échangeur bidirectionnel de lipides puisqu'il permet d'effluer du cholestérol non estérifié et des phospholipides vers les HDL naissantes mais pas vers l'apoA-I libre (Ji, 1997). Sa capacité d'échangeur bidirectionnel de lipides dépend essentiellement du gradient de concentration et de la nature des lipides contenus par le ligand. Son rôle dans cette étape est important puisque les souris ne possédant pas SR-BI dans leurs macrophages ont un risque accru de développer des plaques d'athérosclérose sans que le transport revers du cholestérol ne soit touché (Mineo & Shaul, 2012a).

5. LCAT (AAB34898.1) :

C'est une enzyme de 440 acides aminés qui après clivage d'un peptide signal de 24 résidus donne une protéine mature de 416 acides aminés (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>). Principalement synthétisée par le foie, elle est également exprimée en faible quantité dans les testicules et les astrocytes. Elle subit des glycosylations post-traductionnelles pour avoir quatre sites de N-glycosylation et deux sites de O-glycosylation (Schindler, Settineri, Collet, Fielding, & Burlingame, 1995). La signification biologique des sites de O-glycosylation n'est pas totalement élucidée au contraire des sites de N-glycosylation qui sont importants pour son activité (Qu, Fan, Blanco-Vaca, & Pownall, 1993). Des expériences de mutagenèse dirigée ont montré que l'élimination de ces sites de glycosylation ne modifie pas sa sécrétion mais affecte son activité (diminuée lors de la perte des sucres en position 20,84 et 272, augmentée lors de la mutation de l'arginine en 384) (O, Hill, Wang, McLeod, & Pritchard, 1993). Cette protéine circule dans le sang soit liée à des lipoprotéines soit sous forme libre (environ 75% de son activité plasmatique est toutefois associée aux HDL) (Savel *et al*, 2012).

Son principal activateur physiologique est l'apoA-I mais d'autres apolipoprotéines peuvent aussi l'activer bien que ce soit moins efficace. C'est le cas des apoA-II, apoA-IV, apoC-I à III et apoE (Kunnen & Van Eck, 2012). Son activité enzymatique consiste en une réaction de trans-estérification du groupement hydroxyle en position trois du cholestérol libre. Cette réaction se fait à partir de l'acide gras en position *sn*-2 d'une phosphatidylcholine (qui appartient au groupe des lécithines). La LCAT possède deux types d'activité

enzymatique : le transfert se fait soit sur le cholestérol transporté par les lipoprotéines contenant de l'apoA-I (**activité α**) soit sur celui porté par les lipoprotéines comportant de l'apoB (**activité β**). Une fois estérifié, le cholestérol peut alors migrer vers le cœur hydrophobe de la lipoprotéine. Cela permet donc de maintenir un **gradient de cholestérol libre** entre les membranes cellulaires et la surface de la particule HDL permettant ainsi un flux continu des tissus vers les HDL (Kunnen & Van Eck, 2012).

Elle contribue également aux effets anti-oxydant et anti-inflammatoire des HDL en hydrolysant le facteur d'activation plaquettaire ou platelet-activating factor (PAF) et les phospholipides oxydés (Liu & Subbaiah, 1994), (Goyal, 1997).

Ces propriétés bénéfiques ne doivent cependant pas faire oublier que le rôle exact de la LCAT est toujours débattu dans l'athérosclérose. En effet, les déficits en LCAT ne sont pas forcément reliés à un risque accru comme nous le verrons dans le chapitre 3 et les études chez l'animal ne permettent pas d'attribuer un rôle certain à cette enzyme (Kunnen & Van Eck, 2012).

6. PLTP :

La PLTP appartient à la famille de transfert des lipides et de liaison du lipopolysaccharide tout comme la CETP. C'est une glycoprotéine de 493 acides aminés possédant six sites de N-glycosylation (Albers, Vuletic, & Cheung, 2012). Elle transfère de nombreuses molécules tels que les diacylglycérols, l'acide phosphatidique, les sphingomyélines, les phosphatidylcholines, les phosphatidylglycérols, les cérebrosides, les phosphatidylétanolamines ou bien encore l' α -tocophérol, puissant antioxydant (Rao, Albers, Wolfbauer, & Pownall, 1997) (Desrumaux *et al*, 1999). Elle est présente sous deux formes dans le plasma, une forme active pouvant transférer les phospholipides et une forme inactive dont la fonction physiologique est inconnue (Albers *et al*, 2012). Ces deux formes de PLTP sont retrouvées dans des complexes pauvres en lipides (3%) qui contiennent majoritairement de la clusterine (apoJ), du fibrinogène, du plasminogène et de l'apoA-I. Sur les 24 protéines retrouvées dans ces complexes lors de cette étude, 14 d'entre elles sont des protéines de la phase aiguë de l'inflammation et 8 sont des protéines impliquées dans la régulation du complément (Cheung, Vaisar, Han, Heinecke, & Albers, 2010). La PLTP est également retrouvée au sein des HDL, elle permet ainsi de médier le transfert des

phospholipides entre les vésicules unilamellaires et les HDL. Elle est aussi impliquée dans l'échange de phospholipides entre les lipoprotéines (Yazdanyar, Yeang, & Jiang, 2011).

De nombreuses études ont été conduites chez l'animal et notamment la souris, soit en invalidant soit en surexprimant cette enzyme. Celles-ci ont montré que l'expression de la PLTP est requise pour avoir une biogénèse des HDL normale. Une surexpression pouvant déstabiliser les HDL et augmenter leur dégradation sans que l'on sache si des variations physiologiques d'expression ont un impact significatif sur leur taux. De plus, une élévation de son expression dans la circulation systémique semble promouvoir l'athérogénèse au contraire d'une production locale par les macrophages de la paroi artérielle qui serait anti-athérogène (Albers *et al*, 2012).

7. CETP :

La CETP est une protéine de transport complexe reconnue à la fois pour son potentiel proathérogène mais aussi pour son rôle.... antiathérogène. Chez l'homme, son ARNm est essentiellement retrouvé dans le foie, la rate et le tissu adipeux (Fleisher, Tall, Witte, Miller, & Cannon, 1982), (Tall, 1993). Cette protéine de 493 acides aminés donne après clivage du peptide signal une glycoprotéine mature hydrophobe de 476 acides aminés qui est essentiellement retrouvée associée aux HDL. Son action passe par l'échange de cholestérol estérifié, produit dans les HDL sous l'action de LCAT, en direction des LDL et des VLDL, ces dernières fournissant en retour des molécules de triglycérides aux HDL. Son effet est donc de dépléter les HDL en esters de cholestérol avec un enrichissement en triglycérides conduisant à une réduction de leur taille (Lewis & Rader, 2005). En conditions normotriglycéridémiques, le transfert des esters de cholestérol se fait essentiellement vers les LDL. En revanche, quand la concentration en VLDL augmente, le transfert se fait surtout vers les VLDL qui deviennent potentiellement plus athérogène (P. J. Barter, 2003). Ces échanges conduisant à diminuer les taux de HDL-cholestérol tout en augmentant ceux des VLDL contribuent alors à la formation d'un profil lipoprotéique plasmatique athérogène. Malgré tout, ce transfert des esters de cholestérol vers les LDL et VLDL fournit une voie supplémentaire pour ramener le cholestérol au foie via le LDL récepteur. De plus, les HDL enrichies en triglycérides réagissent plus facilement avec la PLTP ce qui permet de générer des pré- β HDL pauvres en lipides stimulant donc la première étape du TRC. Un autre point intéressant est que la CETP est présente dans

les macrophages situés dans les lésions d'athérosclérose ce qui stimulerait l'efflux du cholestérol vers les HDL. Il semblerait de plus que les adipocytes jouent un rôle dans la captation des esters de cholestérol et que la CETP interviendrait dans environ 15% de cette captation (processus affecté du terme de « **transport latéral du cholestérol** ») (Klerkx *et al*, 2006). Un des derniers effets athéroprotecteurs du transporteur serait la stimulation de la capture des esters de cholestérol des HDL par l'hépatocyte, sans que le mécanisme soit pour l'instant expliqué (Dullaart, Dallinga-Thie, Wolffenbuttel, & van Tol, 2007). L'étude de ces mêmes auteurs montre aussi que des concentrations élevées de CETP sont associées à une diminution du risque cardio-vasculaire lorsque les concentrations en triglycérides sont basses. Le contexte métabolique semble donc déterminer l'impact de la CETP sur le développement de l'athérosclérose. Les études chez l'animal ont également conduit à des résultats hétérogènes notamment lors de l'introduction du gène de la CETP chez des espèces qui ne la possède pas (souris, rat). Par exemple, l'introduction de la CETP chez des souris C57BL/6 soumises à un régime enrichi en cholestérol se traduit par formation de stries lipidiques plus importante que chez les souris contrôles. Au contraire, l'introduction de la CETP chez des souris surexprimant l'apoC-III et hypertriglycéridémiques, l'effet global était plutôt anti-athérogène probablement dû à une moindre concentration en cholestérol dans les petits VLDL remnants (P. J. Barter, 2003). Ces propriétés ambivalentes sont également illustrées par l'hétérogénéité des phénotypes humains associés aux polymorphismes de ce gène comme nous le verrons dans la troisième partie de ce mémoire.

8. Les lipases :

a. Les lipases endothéliale et hépatique :

Ces deux enzymes, connues pour réguler négativement les taux plasmatiques de HDL-C, appartiennent à la famille des **triacylglycérol lipases** (tout comme la lipoprotéine lipase). Elles possèdent chacune leur spécificité de substrat puisque la lipase hépatique (LH) a comme substrat les phospholipides et les triglycérides alors que la lipase endothéliale (LE) a une activité phospholipasique prédominante et très peu d'activité triglycéridasique (tableau 14).

La **LH** est synthétisée dans le foie et se lie aux surfaces des cellules parenchymateuses dans l'espace de Disse mais également dans les glandes surrénales, les ovaires et les macrophages (Jansen, 2002). En plus de son activité lipolytique qui permet notamment de convertir les larges HDL-2 en plus petites et plus denses HDL-3 et les VLDL en LDL (Chatterjee & Sparks, 2011), la LH promeut la captation des lipoprotéines grâce à son ancrage dans le tissu hépatique (Annema & Tietge, 2011). Son rôle dans l'athérosclérose est toujours largement débattu, que ce soit dans les études chez l'animal ou de l'impact de certains polymorphismes affectant son activité (tableau 14 et chapitre 3).

La **LE** qui est notamment synthétisée et sécrétée par les cellules endothéliales est structurellement très proche de la LH et de la lipoprotéine lipase avec respectivement 41% et 44% d'homologie de séquence en acides aminés (Yasuda, Ishida, & Rader, 2010). Elle est liée aux protéoglycanes de surface des cellules vasculaires où elle exerce son action. Son activité phospholipasique est spécifique de la position *sn-1* et bien qu'elle puisse agir sur toutes les lipoprotéines, son action se fait préférentiellement sur les HDL (Annema & Tietge, 2011). Elle possède en plus de son activité catalytique, et tout comme la lipoprotéine lipase et la LH, une fonction non catalytique de pontage avec les lipoprotéines. Il a été montré que sa surexpression accélère à la fois le catabolisme rénal de l'apoA-I et la captation hépatique du cholestérol par SR-BI (Maugeais *et al*, 2003), (Nijstad *et al*, 2009). Ici encore, les données recueillies des études chez l'animal ne sont pas très claires sur le rôle exact de la LE sur l'athérosclérose (tableau 14).

	Lipase hépatique	Lipase endothéliale
Structure	65 kDa, glycoprotéine	68 kDa, glycoprotéine
Expression tissulaire	hépatocytes, macrophages	cellules endothéliales, macrophages, thyroïde, hépatocytes, rein, poumon, ovaire, testicule, placenta
Activité lipolytique	TG≥PL	PL>>TG
Substrat	toutes les lipoprotéines	surtout HDL
Impact sur :		
- les taux plasmatiques de HDL-C	KO : ↑ surexpression : ↓	KO : ↑ surexpression : ↓
- l'efflux du cholestérol	KO : ↑ ↔	KO : ↑↓ surexpression : ↓↑
- la captation hépatique du HDL-C	KO : ↓ surexpression : ↑	KO : ↓ surexpression : ↑
- les sécrétions biliaires en cholestérol	KO : ↔	surexpression : ↔
- l'excrétion des stérols neutres fécaux et les acides biliaires	KO : ↔	surexpression : ↔
- le transport retour du cholestérol (macrophage vers fèces)	KO : ↔	KO : ↔ surexpression : ↓
- l'athérosclérose	KO : ↑↓ surexpression : ↓	KO : ↓ ↔

Tableau 14 : caractéristiques des lipases hépatique et endothéliale. HDL-C= HDL-cholestérol, KO= Knock-out, TG= triglycérides, PL= phospholipids. D'après (Annema & Tietge, 2011).

b. La lipoprotéine lipase :

Sécrétée par de nombreux tissus tels que le tissu adipeux ou le muscle, cette enzyme est capable d'hydrolyser les triacylglycérols des chylomicrons et des VLDL circulants tout en possédant une activité mineure phospholipasique. Son site d'action physiologique est la surface luminale des cellules endothéliales capillaires auxquelles elle est liée par des chaînes d'héparan sulfate et de protéoglycanes (Mead, Irvine, & Ramji, 2002). De moindre importance pour les HDL que les deux premières lipases, la lipoprotéine lipase intervient cependant également dans leur métabolisme. En effet, son activité enzymatique régule les taux de HDL-C par différentes voies : durant l'hydrolyse des lipoprotéines riches en

triglycérides, les lipides de surface et les apolipoprotéines sont transférés aux HDL. De plus, en diminuant les taux plasmatiques de triglycérides, la LPL limite les échanges entre VLDL et HDL par la CETP (I. J. Goldberg, 1996). Les concentrations plasmatiques en HDL-C corrélaient d'ailleurs positivement avec son activité plasmatique post-héparine et les sujets souffrant de déficits en LPL ont des concentrations plasmatiques réduites en HDL (Lewis & Rader, 2005).

b. Catabolisme :

i. **Dégradation hépatique** :

Le site majeur de captation du HDL-cholestérol est le foie. Le mécanisme le mieux connu et expliqué à ce jour est la voie impliquant **SR-BI** qui permet la captation sélective des esters de cholestérol provenant des HDL et des LDL. La deuxième voie est celle impliquant trois types de récepteurs : la **F₁-ATPase**, le récepteur purinergique **P2Y₁₃** et un troisième récepteur encore inconnu qui permet la capture de l'holoparticule HDL.

Une fois parvenu au foie, le cholestérol est pris en charge pour être éliminé soit sous forme de cholestérol libre soit sous forme d'acides biliaires après transformation par différents cytochromes. Dans la bile, les acides biliaires sont les molécules majoritaires puisqu'elles représentent environ 85% de la masse sèche, le cholestérol libre n'en représentant que 10% (Malaval, 2008, page 39). Les acides biliaires sont les premiers et derniers représentants du métabolisme lipidique puisqu'issus de la dégradation du cholestérol, leur sécrétion intestinale favorise l'absorption des lipides intestinaux. Leur métabolisme est finement régulé et fait intervenir deux voies : la voie neutre impliquant le cytochrome 7A1 (CYP 7A1) et la voie acide impliquant le cytochrome 27A1 (CYP 27A1) ; le cytochrome 8B1 (CYP 8B1) intervient quant à lui dans les deux voies pour moduler la composition biliaire et ainsi agir sur la balance acide cholique-acide chénodésoxycholique (Malaval, 2008, pages 40-43).

Il faut aussi se souvenir que les esters de cholestérol peuvent être transférés *via* la CETP aux lipoprotéines de basse densité (LDL, VLDL). Ce sont ces dernières qui sont alors capables de ramener le cholestérol au foie par l'intermédiaire du **LDLR**. Cette voie parallèle est nommée **voie alterne de transport retour du cholestérol** et est quantitativement importante en situation de normolipémie. L'injection de HDL marquée avec du cholestérol radioactif a en effet montré que le cholestérol excrété dans la bile était largement transféré

aux lipoprotéines contenant de l'apoB (Schwartz, VandenBroek, & Cooper, 2004). Cependant, en situation d'hypertriglycéridémie, les échanges médiés par la CETP sont majorés et ils conduisent à l'enrichissement des VLDL en cholestérol estérifié (dont la lipolyse est retardée) et à la formation de HDL riches en triglycérides mais pauvres en cholestérol. Dans ces conditions, la voie directe de captation des HDL est moins efficace et la voie alterne passant par les LDL est également ralentie. Il est intéressant de noter que suivant la nature de la lipoprotéine qui ramène le cholestérol au foie, son devenir va être différent. Alors que le cholestérol ramené par les HDL est *a priori* dirigé vers les canalicules biliaires pour constituer la majorité du cholestérol biliaire (voie extralysosomale), le cholestérol ramené par le LDL passe par une voie intralysosomale pour soit synthétiser la majeure partie des acides biliaires soit pour être stocké avant d'être remis en circulation (Toussaint *et al*, 2003, page 73).

1. CLA-1 / SR-BI :

En plus de permettre l'efflux de cholestérol des cellules vers les HDL, ce récepteur est également capable de capter les esters de cholestérol provenant des HDL, les apolipoprotéines n'étant pas internalisées par cette voie. Les mécanismes moléculaires de captation du cholestérol sont pour l'instant controversés mais pourraient impliquer l'internalisation de la HDL entière avec resécration d'une particule HDL déplétée en cholestérol (rétro-endocytose) ou bien la formation d'un canal hydrophobe, ces deux mécanismes pouvant se compléter (L. Martinez *et al*, 2004).

Cette voie est d'importance physiologique majeure chez la souris puisque son invalidation par knocking-out s'accompagne d'une augmentation des taux de HDL d'un facteur deux qui est principalement lié à une accumulation de cholestérol estérifié ou non estérifié dans de larges particules HDL. Sont également associés à cela une diminution de la captation hépatique de cholestérol, une moindre sécrétion biliaire du cholestérol, un transport retour du cholestérol altéré par rapport aux souris contrôles et une plus grande susceptibilité à l'athérosclérose (Covey, Krieger, Wang, Penman, & Trigatti, 2003; Mardones *et al*, 2001; Rigotti *et al*, 1997). A l'inverse, une surexpression de SR-BI chez des souris, s'accompagne d'une diminution des taux de HDL, d'une clairance accélérée des HDL-C, d'une augmentation de la captation sélective du cholestérol d'un contenu biliaire en cholestérol augmenté ainsi que d'une diminution de la sévérité de l'athérosclérose (Arai, 1999; Kozarsky

et al, 1997; Ueda, 1999). Toutefois, ce modèle animal présente des limites puisque les souris, qui ne possèdent pas la CETP, ont un profil lipoprotéique différent de celui de l'homme avec majoritairement des HDL. C'est pour cela que des souris invalidées pour SR-BI mais exprimant la CETP ont vu le jour. Ces souris ont des taux de HDL-C plus bas d'un facteur 1.5 à 2 selon le type de régime (standard ou occidental) sans qu'aucune modification de susceptibilité à l'athérosclérose ne soit détectée. Les auteurs attribuent alors comme cause probable au développement de l'athérosclérose chez les souris SR-BI KO la persistance d'un haut niveau de VLDL-cholestérol et un statut oxydatif augmenté (Hildebrand *et al*, 2010). El Bouhassani *et al* (El Bouhassani *et al*, 2011) ont depuis montré que l'invalidation conditionnelle de SR-BI dans le foie de souris s'accompagne d'une accélération de la formation des lésions lipidiques aortiques que la CETP soit exprimée ou pas. Des résultats différents ont été obtenus chez le lapin (espèce exprimant la CETP) où l'inhibition de SR-BI par interférence d'ARN diminue de 50% la taille des lésions d'athérosclérose (Demetz *et al*, 2012). Chez l'homme, l'importance de ce récepteur est plus hypothétique puisqu'il est peu exprimé dans le foie.

2. Voie de la F1-ATPase/P2Y₁₃ :

Notre laboratoire a tout d'abord montré que les hépatocytes humains possèdent la capacité de capter par endocytose les particules HDL *via* la formation de vésicules mantelées de clathrine (Garcia *et al*, 1996) et que cette endocytose fait intervenir deux types de récepteurs, un premier de haute affinité pour l'apoA-I libre ou liée aux HDL et un deuxième de basse affinité mais de grande capacité pour l'holoparticule HDL. Le premier récepteur est la **F₁-ATPase** (récepteur de haute affinité pour l'apoA-I, K_d ~ 10⁻⁹M) qui est classiquement connue pour constituer le complexe catalytique de l'ATP synthase mitochondriale (L. O. Martinez *et al*, 2003). L'activité hydrolase de ce récepteur est stimulée par la liaison de l'apoA-I et l'ADP ainsi généré va pouvoir aller activer spécifiquement le deuxième acteur de cette voie : le **récepteur P2Y₁₃** (Jacquet *et al*, 2005). Ce récepteur déclenche une voie de signalisation intra-cellulaire impliquant RhoA/ROCK I (Malaval *et al*, 2009) qui permet la régulation de l'endocytose de l'holoparticule HDL *via* un troisième récepteur de moins grande affinité (K_d = 10⁻⁷ M), dont l'identité est inconnue. De façon intéressante, la protéine IF1 (Inhibitory Factor 1) classiquement connue pour être un inhibiteur naturel de l'activité

ATPasique de l'ATP synthase mitochondriale est également capable d'inhiber la F_1 -ATPase de surface ce qui a pour conséquence de bloquer la stimulation de la voie d'endocytose par l'apoA-I (Campanella *et al*, 2008; L. O. Martinez *et al*, 2003). En 2011, Genoux *et al* (Genoux *et al*, 2011) ont mis en évidence dans une population d'hommes normolipémiques l'IF1 dans le sang circulant à des concentrations sériques de 0.22 à 0.82 mg/L. Ces taux étant de façon très intéressante corrélés positivement à ceux du HDL-C et négativement à ceux des triglycérides. Depuis, il a été montré que les concentrations moyennes d'IF1 sont plus basses chez les coronariens que chez leurs pairs (population totale de 1317 hommes, 0.43 mg /L *versus* 0.53 mg/L respectivement, $p < 0.001$). De plus, après de multiples ajustements sur les facteurs de risque cardio-vasculaires, il est apparu que les taux d'IF1 sont négativement liés à la maladie coronarienne (Genoux *et al*, 2013).

L'importance de cette voie dans la captation des lipoprotéines HDL a été confortée par l'utilisation de plusieurs modèles animaux. Notre équipe a tout d'abord étudié l'effet de l'invalidation de *P2ry13* par knocking-out chez des souris C57BL/6 (Fabre *et al*, 2010). Par rapport à leurs contrôles sauvages, ces souris présentent une diminution du contenu hépatique en cholestérol total et HDL ainsi qu'une diminution des sécrétions biliaires en cholestérol et phospholipides sans que le bilan lipidique plasmatique ne soit altéré. Ces modifications sont accompagnées d'une diminution du transport retour du cholestérol des macrophages vers les fèces. A l'inverse, une stimulation du récepteur $P2Y_{13}$ par un agoniste partiel s'accompagne d'une augmentation des sécrétions biliaires et de la capture hépatique des HDL. Une autre équipe a également étudié l'effet de l'invalidation de ce gène chez des souris et ont obtenu des résultats différents. Ils ont notamment constaté une diminution des taux plasmatiques de HDL-C et de cholestérol total ainsi qu'un transport retour du cholestérol diminué (Blom *et al*, 2010). Alors que nous avançons comme hypothèse dans notre travail qu'il pourrait y avoir régulation des taux plasmatiques de HDL-C par surexpression hépatique des gènes *abca1* et *abcg1* pour équilibrer la balance synthèse-dégradation des HDL, Blom et ses collègues ont une toute autre vision. L'augmentation surprenante des taux de HDL-C dans leur travail pourrait être due à des mécanismes compensateurs de captation des lipoprotéines *in vivo* ou bien à une modification, non pas du métabolisme du HDL, mais du devenir hépatique et extra-hépatique de métabolites qui à leur tour modifient le métabolisme lipoprotéique. Nous avons également récemment étudié

l'effet de l'activation chronique du récepteur P2Y₁₃ par un agoniste partiel sur le bilan lipidique (Serhan *et al*, 2013). La stimulation de ce récepteur pendant trois jours s'accompagne cette fois-ci d'une diminution des taux de HDL-C associée à une augmentation du flux de sécrétions biliaires sans modification du profil hépatique en lipides.

a. La F₁-ATPase :

L'ATP synthase ou F₁F₀-ATPase est un complexe enzymatique, composé des parties F₁ et F₀, présent dans le feuillet interne de la mitochondrie et qui permet la production d'ATP pour la cellule. F₀ est enchâssée dans la membrane et joue un rôle de canal pour les protons issus des quatre premières réactions de la chaîne respiratoire. Le flux de protons fait alors tourner la partie F₀ imprimant ainsi des changements de conformation de F₁ qui devient catalytiquement active. Elle est alors capable de générer de l'ATP ou de l'ADP suivant le sens de la force proton-motrice (figure 14). L'unité catalytique F₁ est formée par cinq sous-unités ($\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$) tandis que F₀ est composée par un nombre variable de sous-unités.

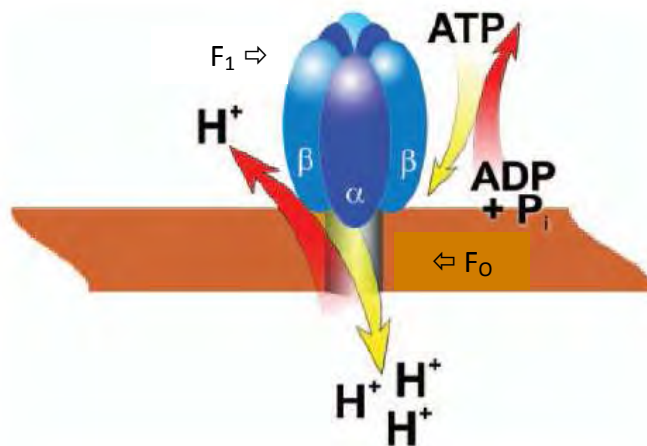


Figure 14 : mécanisme d'action de la F₁F₀-ATPase. F₀ fonctionne comme une pompe à protons et F₁ est capable de synthétiser (en rouge) ou d'hydrolyser (en jaune) l'ATP suivant le sens de la force proton-motrice. D'après (Chi & Pizzo, 2006).

L'activité catalytique de l'enzyme est portée par les trois sous-unités β au niveau de leur interface avec les sous-unités α et ce sont elles qui ont été retrouvées à la surface hépatocytaire en 2003 (L. O. Martinez *et al*, 2003). Son activité d'hydrolyse de l'ATP est stimulée par la liaison de l'apoA-I sur l'ecto-F₁-ATPase. Cela permet donc de réguler l'endocytose des HDL. Partenaire essentiel à la captation de l'holoparticule HDL, la F₁F₀-ATPase est avant tout cruciale dans le fonctionnement de la chaîne respiratoire

mitochondriale. Les mutations de cette enzyme sont par conséquent associées à des maladies graves et souvent mortelles dès le plus jeune âge. Les plus fréquentes concernent des mutations du gène *ATP6* codant une des sous-unités de F_0 : ce sont le syndrome de Leigh (encéphalomyélopathie nécrosante subaiguë entraînant 75% de décès entre l'âge de deux et trois ans par défaillances respiratoire ou cardiaque) et le NARP (Neurogenic muscle weakness, Ataxia, and Retinitis Pigmentosa d'évolution plus favorable) (Thorburn & Rahman, 2011). A noter aussi que cette enzyme est exprimée, outre les hépatocytes, à la surface de nombreux types cellulaires comme les cellules endothéliales, les kératinocytes, les adipocytes, de nombreuses lignées tumorales ainsi que les plaques neurofibrillaires présentes dans le cerveau des malades atteints de la maladie d'Alzheimer (Chi & Pizzo, 2006). Par ailleurs, sur les cellules endothéliales, son activation par de l'apoA-I se traduit par des effets prolifératifs et anti-apoptotiques (Radojkovic *et al*, 2009).

b. P2Y₁₃ :

Ce membre de la famille des récepteurs nucléotidiques P2Y (récepteurs couplés à une protéine G) n'a été caractérisé que depuis quelques années. Au début des années 2000, plusieurs équipes ont mis en évidence l'existence d'un récepteur purinergique présentant 48% d'homologie de séquence avec P2Y₁₂, ils l'ont alors nommé P2Y₁₃ (Communi *et al*, 2001; F. L. Zhang *et al*, 2002). Localisé chez l'homme en 3q24, *P2RY13* est très proche de *P2RY12* qui est en 3q24-q25 et *P2RY14* qui est en 3q24-q25.1. Les trois protéines codées par ces gènes sont d'ailleurs couplées à une protéine **G α i** au contraire des cinq autres récepteurs purinergiques connus (P2Y₁, 2, 4, 6, 11) qui sont couplés à une protéine G α q (Abbracchio *et al*, 2006). *P2RY1* est par ailleurs lui aussi localisé sur le chromosome 3 en 3q25.2. De façon intéressante, seuls P2Y₁, P2Y₁₂ et P2Y₁₃ sont activés par l'**ADP**.

Son expression est assez large avec de hauts niveaux d'expression dans la rate, les leucocytes, la moelle osseuse et les ganglions suggérant un rôle dans l'immunité mais aussi dans le cerveau ou le foie. Exprimé par les lymphocytes et surtout les monocytes, son rôle n'est pas élucidé mais il pourrait avoir une fonction dans leur chimiotaxie (L. Wang, Jacobsen, Bengtsson, & Erlinge, 2004). Concernant son rôle dans le cerveau, de récentes publications mettent en avant sa fonction dans la douleur (Kobayashi, Yamanaka, Yanamoto, Okubo, & Noguchi, 2012; Malin & Molliver, 2010), la protection contre le stress oxydant

(Espada *et al*, 2010), l'inhibition de l'élongation axonale (del Puerto *et al*, 2012) ou bien encore la différenciation neuronale (Yano, Tsukimoto, Harada, & Kojima, 2012). C'est également le seul récepteur purinergique fortement exprimé dans les érythrocytes, son activation inhiberait le trop fort relargage d'ATP par le globule rouge lors de conditions de stress telles que l'hypoxie ou l'acidose (L. Wang *et al*, 2005). Les souris invalidées pour ce récepteur ne présentent pas de différences morphologiques majeures avec des souris sauvages. On peut toutefois remarquer que leur remodelage osseux est différent avec une surface osseuse augmentée (Blom *et al*, 2010) et une diminution du remodelage osseux (N. Wang *et al*, 2012). D'un côté plus métabolique, des équipes se sont penchées sur le rôle de P2Y₁₃ dans la régulation du diabète puisqu'il est exprimé dans le pancréas. La première a montré que son activation peut inhiber l'insulino-sécrétion sur des îlots et des cellules β isolées mais aussi *in vivo* sur des souris (S Amisten *et al*, 2010). Son activation serait également responsable d'un effet pro-apoptotique sur les cellules β (Tan, Salehi, Svensson, Olde, & Erlinge, 2010). Les souris invalidées pour ce récepteur ne montrent toutefois pas de modification d'insulino-sensibilité ou de tolérance à une charge orale en glucose différente (Blom *et al*, 2010). Enfin, outre son rôle dans la captation des particules HDL par le foie, il pourrait être impliqué dans le blocage de la sécrétion et la formation des HDL (Chatterjee & Sparks, 2012). Une étude récente a également mis en lumière que l'ARNm de *P2RY13* était détectable dans les cellules souches mésenchymateuses dérivées du tissu adipeux (Zippel *et al.*, 2012). Biver *et al* (Biver *et al.*, 2013) ont depuis montré que, suite à une stimulation spécifique par un cocktail adipogénique, le nombre d'adipocytes générés à partir de cellules souches mésenchymateuses n'exprimant pas le récepteur P2Y₁₃ est augmenté par rapport à ce qui est obtenu dans des cultures de cellules souches exprimant P2Y₁₃. Ces résultats suggèrent donc que l'activation de P2Y₁₃ inhibe la différenciation adipocytaire. Ce phénomène, selon les auteurs, pourrait passer par un contrôle négatif par P2Y₁₃ de la maturation des pré-adipocytes en adipocytes. Cette même étude a de plus évalué l'importance de ce récepteur dans l'ostéogenèse et a pointé son rôle dans l'activation de la différenciation des pré-ostéoblastes en ostéoblastes.

Concernant l'homme, aucune mutation de *P2RY13* n'a été mise en évidence comme étant associée à une pathologie. La mutation **Met-179-Thr** (ou M179T) a notamment été étudiée et sa présence ne semble associée ni à l'infarctus du myocarde (étude incluant 1244

cas et 2488 contrôles) ni au diabète de type II (307 cas et 307 contrôles) (Stefan Amisten *et al*, 2008).

ii. Dégradation rénale :

Alors que SR-BI ne peut capter que les esters de cholestérol, nous savons maintenant que l'apoA-I peut être dégradée par le rein. Dès les années 1980, il a été prouvé que chez le rat, il s'agit du site majeur de sa dégradation (C. K. Glass, Pittman, Keller, & Steinberg, 1983; C. Glass, Pittman, Civen, & Steinberg, 1985). Plus récemment, c'est la **cubiline** qui a été identifiée comme étant un récepteur de haute affinité pour l'apoA-I dans le cortex rénal (Kozyraki *et al*, 1999). Ce récepteur est capable de médier *in vitro* dans des cellules embryonnaires l'endocytose de l'holoparticule HDL, la conduisant ensuite à sa dégradation lysosomale (Hammad *et al*, 1999). L'apoA-I faiblement lipidée ainsi que les petites HDL de forme discoïdale seraient en fait filtrées par le glomérule rénal avant d'être métabolisées dans le tubule proximal (Moestrup & Kozyraki, 2000). De façon intéressante, la cubiline est couplée à un autre récepteur, la mégaline, qui est quant à elle récepteur d'autres apolipoprotéines telles que l'apoB, l'apoE, l'apoJ ou l'apoH (Christensen & Birn, 2002).

C) Propriétés :

Les HDL sont responsables de très nombreuses propriétés directement reliées ou non à la protection vis-à-vis de l'athérosclérose. Cette partie se veut donc un rappel des propriétés les plus connues mais aussi celles qui sont en train d'émerger. Il est à noter que l'hétérogénéité de taille et de composition des particules HDL se traduit par des fonctionnalités différentes. Par exemple, les petites HDL3 sont de meilleurs antioxydants et anti-inflammatoires que les HDL2 et semblent également être plus protectrices vis-à-vis de l'apoptose endothéliale (Rosenson *et al*, 2011).

a. Le transport retour du cholestérol :

Ce terme de transport retour du cholestérol (RCT) a été introduit par Glomset et Norum dès 1973 afin de désigner le flux centripète de cholestérol des tissus périphériques vers les fèces par le biais d'une élimination hépatobiliaire (van der Velde, Brufau, & Groen, 2010). Les HDL jouent un rôle clé dans ce processus qui correspond en fait à l'ensemble de

leur métabolisme que nous venons de voir. Ce métabolisme permet ainsi de réduire l'accumulation de cholestérol dans le mur artériel en effluant le cholestérol des macrophages spumeux ce qui empêche donc potentiellement le développement de l'athérosclérose. D'autres cellules participent également à l'efflux de cholestérol vers les HDL, c'est notamment le cas des adipocytes (Y. Zhang *et al*, 2010). Ce processus fait appel à différents partenaires dont l'apoA-I (apoprotéine majoritaire des HDL), les transporteurs d'efflux qui tiennent un rôle central dans l'efflux lipidique et une protéine de transfert qui semble avoir un rôle crucial dans l'homéostasie du HDL-cholestérol, la CETP. Une vue d'ensemble de ce transport retour du cholestérol est donnée ci-dessous.

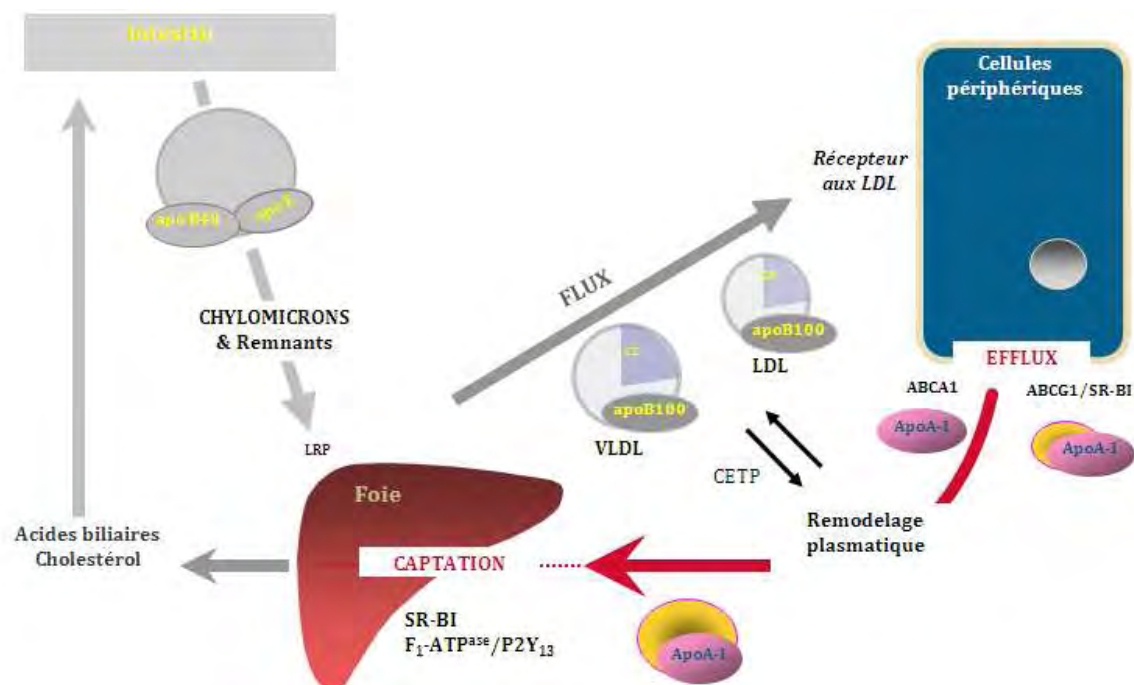


Figure 15 : le transport retour du cholestérol. Dans les macrophages et cellules périphériques, l'efflux de cholestérol se fait soit de façon passive *via* SR-BI ou active *via* ABCA1 et ABCG1. ABCA1 permet l'efflux de lipides vers une apoA-I libre ou faiblement lipidée (pré-β HDL) tandis qu'ABCG1 et SR-BI lipident les α-HDL. Après un remodelage plasmatique intense impliquant une estérification du cholestérol libre par la LCAT et des échanges lipidiques avec les VLDL et LDL par le biais des CETP et PLTP, la particule HDL-2 riche en triglycérides est hydrolysée par la lipase hépatique pour donner un remnant de HDL captée par le foie. La captation se fait alors par SR-BI (esters de cholestérol) et par la voie de la F₁-ATPase/P2Y₁₃ (holoparticule).

L'existence d'une voie complémentaire d'efflux impliquant l'intestin a récemment été découverte et nommée **efflux trans-intestinal de cholestérol** (Transintestinal cholesterol efflux ou **TICE**) (van der Velde *et al*, 2010). Chez la souris, cette voie permettrait d'effluer environ 70% des stérols fécaux neutres, essentiellement dans la partie proximale de l'intestin grêle. L'importance de ce mécanisme chez l'homme est toutefois en cours d'étude mais semble être bien réel comme le montre la présence de stérols dans les fèces de patients présentant une obstruction biliaire (Brufau, Groen, & Kuipers, 2011). Les HDL ne seraient toutefois pas les lipoprotéines impliquées dans cette voie d'élimination (Temel & Brown, 2012).

b. Activité anti-oxydante :

L'oxydation des LDL dans l'espace sous-endothélial est considérée comme un évènement majeur dans l'initiation et le développement de la plaque d'athérome (Diaz, Frei, Vita, & Keaney, 1997). Ces particules contiennent en effet de nombreux lipides oxydés toxiques tels que des aldéhydes, des oxystérols ou des peroxydes lipidiques. Cette forme pro-athérogène de LDL est captée par les récepteurs scavengers des macrophages qui se transforment en cellules spumeuses. Elle est aussi directement responsable d'effets délétères tels que l'apoptose des cellules endothéliales, la rupture de la chape fibreuse *via* la sécrétion de métalloprotéinases ou bien encore d'effets toxiques sur les cellules souches (endothéliales ou musculaires) (Yang, Mohamed, & Zhou, 2012). Les LDLox peuvent également se retrouver dans la circulation sanguine où leurs taux élevés reflètent la présence d'une maladie coronarienne (Holvoet *et al*, 2001). La prévention de l'oxydation des LDL peut ainsi prévenir ou du moins ralentir l'initiation et la progression de la plaque d'athérome. C'est dans ce cadre que les HDL jouent un rôle majeur et notamment les HDL-3 petites et denses qui sont supérieures aux HDL-2 dans cette activité (Camont *et al*, 2011). L'**apoA-I** est notamment capable de lier et d'enlever les hydroperoxydes lipidiques des LDL *in vitro*, il en est de même *in vivo* après injection à la souris ou perfusion à l'homme (Navab *et al*, 2000). D'autres apolipoprotéines jouent aussi un rôle anti-oxydant, c'est le cas des **apoA-II**, **apoA-IV**, **apoE** et **apoJ** (Kontush & Chapman, 2006). Néanmoins, le potentiel anti-oxydant de l'apoA-II est controversé comme le soulignent ces auteurs puisque la surexpression de l'apoA-II humaine chez la souris dyslipidémique accélère l'athérosclérose, augmente

l'accumulation aortique des LDLox et réduit l'activité anti-oxydante des HDL. Cet effet pourrait être dû à un déplacement de l'apoA-I et de la paraoxonase par l'apoA-II (Ribas *et al*, 2004). De plus, comme nous l'avons vu, les HDL transportent plusieurs enzymes anti-oxydantes telles que la **PAF-AH**, la **PON-1**, la **LCAT** ou la **GSPx** (Kontush & Chapman, 2006). Par exemple, les souris invalidées pour PON-1 sous régime athérogène présentent des lésions aortiques plus importantes que les souris contrôles et les HDL isolées de ces souris sont incapables de prévenir l'oxydation des LDL *in vitro* (Shih *et al*, 1998). L'activité de cette enzyme est par ailleurs fortement réduite chez les sujets coronariens par rapport à leurs pairs ce qui conduit à l'accumulation de produits d'oxydation lipidiques dans les HDL et à une moindre protection endothéliale (Besler *et al*, 2011). Il est enfin intéressant de noter que les HDL peuvent aussi lier les produits d'oxydation lipidiques provenant des sites inflammatoires avant de les ramener dans le plasma protégeant ainsi les cellules endothéliales de l'activation inflammatoire (Besler, Lüscher, & Landmesser, 2012).

c. Protection endothéliale :

Nous avons vu que l'athérosclérose est caractérisée de façon précoce par une dysfonction endothéliale. Parmi les nombreuses propriétés athéroprotectrices des HDL, figure notamment une **activité vasodilatatrice** avec la stimulation de la production de NO par les cellules endothéliales. Ce puissant agent vasodilatateur inhibe l'apoptose, augmente la prolifération des cellules endothéliales mais facilite aussi la migration endothéliale (Cooke, 2003). Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer ce rôle (Besler *et al*, 2012) :

- La liaison des HDL sur SR-BI permet d'activer directement la NO synthase endothéliale (eNOS) qui est génératrice de NO. La liaison des HDL sur SR-BI déclenche le recrutement d'une phosphoinositide 3-kinase (*via* la tyrosine-kinase Src) qui active Akt et la Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK). Akt phosphoryle alors eNOS sur la sérine 1177 permettant ainsi d'activer l'enzyme. L'effet médié par la MAPK est moins clair.
- L'apport de cholestérol par les HDL *via* SR-BI permet d'empêcher les LDLox de dépléter les cavéoles en cholestérol. SR-BI et CD36 (un récepteur scavenger qui lie les LDL oxydées) sont en effet colocalisés dans les cavéoles qui sont également

les sites de localisation d'eNOS. Une déplétion en cholestérol étant responsable d'une relocalisation de l'enzyme, l'apport de cholestérol par les HDL empêche ainsi la redistribution d'eNOS et sa moindre activation (Uittenbogaard, 2000).

- Les HDL et l'apoA-I sont également capables d'augmenter la quantité protéique d'eNOS sans avoir d'effet sur ses taux d'ARNm. Ceci est associé à l'activation de l'Extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) et d'Akt mais le lien avec l'augmentation du temps de demi-vie d'eNOS n'est pas connu (Rämet *et al*, 2003).
- La liaison de différents lysophospholipides portés par les HDL (sphingosylphosphorylcholine, sphingosine-1-phosphate, lysosulfatide) sur le récepteur endothélial aux lysophospholipides S1P3 permettrait également l'activation d'Akt et donc de eNOS.
- L'efflux des oxystérols par ABCG1 vers les HDL permet de diminuer l'interaction entre eNOS et la cavéoline-1. Cette association réprimant l'activité catalytique de l'enzyme, la dissociation se traduit par une restauration de son activité (Terasaka *et al*, 2010).

A côté de cela, les HDL participent aussi à la régulation de l'**apoptose des cellules endothéliales**. De nombreux facteurs promeuvent cette apoptose, c'est le cas des LDLox, du TNF- α ou de l'homocystéine (Mineo, Deguchi, Griffin, & Shaul, 2006). La pré-incubation de HDL avec des cellules endothéliales humaines (HUVEC) traitées ensuite par du TNF- α permet de diminuer significativement l'activité de la protéase CPP32-like (caspase 3) responsable de l'apoptose dans ces cellules par rapport aux cellules uniquement traitées par du TNF- α (Sugano, Tsuchida, & Makino, 2000). Pour ce qui est des LDLox, il a été montré il y a presque 20 ans que l'apoA-I permet d'augmenter la résistance des cellules endothéliales à ces lipoprotéines. Cet effet anti-apoptotique est lié à une interaction directe entre l'apoA-I et les cellules endothéliales qui empêche l'augmentation intracellulaire de calcium qui est associée à l'effet cytotoxique des LDLox (T. Joy & Hegele, 2008)(Suc, Escargueil-Blanc, Troly, Salvayre, & Nègre-Salvayre, 1997). Les HDL sont également responsables de cet effet et les HDL-3 semblent être supérieures, en termes de cytoprotection par rapport aux autres sous-

fractions même si elles sont toutes capables de diminuer la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (de Souza *et al*, 2010). Cette étude a par ailleurs mis en évidence que l'effet anti-apoptotique des HDL est dû à en grande partie à l'apoA-I (environ 70%), la modification du contenu en sphingosine-1-phosphate (S1P) n'entraînant pas de modification significative de la cytoprotection. La voie de signalisation intra-cellulaire passe par l'activation d'Akt qui phosphoryle BAD (Bcl-2-associated death promoter), protéine pro-apoptotique qui est alors dissociée de BCL-XL (B-cell lymphoma-extra large). Ce dernier devient disponible pour inhiber les voies mitochondriales pro-apoptotiques (J. R. Nofer *et al*, 2001). L'effet de l'apoA-I semble en partie lié à l'activation de la F1-ATPase de surface qui est présente sur de nombreux types cellulaires et en particulier les cellules endothéliales. L'interaction de l'apoA-I libre sur cette ecto-F1-ATPase inhibe l'apoptose de cellules en culture (HUVEC) et stimule leur **prolifération** (Radojkovic *et al*, 2009). Pour ce qui est du mode d'action des HDL entières, il passerait par SR-BI mais aussi par les récepteurs à la S1P. En 2005, Li et ses collègues ont mis en évidence que SR-BI peut, indépendamment de la liaison d'un ligand, promouvoir l'apoptose *via* la voie impliquant la caspase 8 par l'intermédiaire d'un motif CXXS hautement conservé entre les résidus 323 et 326. Cet effet pouvant par ailleurs être réversé par des HDL et eNOS (Okajima, Sato, & Kimura, 2009)(X.-A. Li, Guo, Dressman, Asmis, & Smart, 2005). Les auteurs ont alors suggéré qu'en présence de faibles concentrations en HDL, le stress oxydatif délocalise d'eNOS hors des cavéoles entraînant ainsi l'apoptose induite par SR-BI. La survie endothéliale passe aussi par l'activation des récepteurs S1P₁ et S1P₃. L'ajout de S1P à des HUVEC stimule leur survie et leur **migration**, effet qui est aboli lors de l'utilisation d'oligonucléotide antisens dirigés contre les récepteurs S1P₁ et S1P₃. Et, alors que la migration peut être activée par les deux types de récepteurs, la survie est uniquement liée à la présence de S1P₁. Cet effet, démontré *in vitro*, passe par l'activation de la kinase Rho et de p38 MAPK (Kimura *et al*, 2003). Un des mécanismes possible de la prolifération des cellules endothéliales est proposé figure 16. De façon complémentaire, les HDL modifient la différenciation et la fonction des cellules progénitrices endothéliales (EPC) *via* l'activation de SR-BI, PI3K/Akt, MAPK et eNOS (Mineo & Shaul, 2012b).

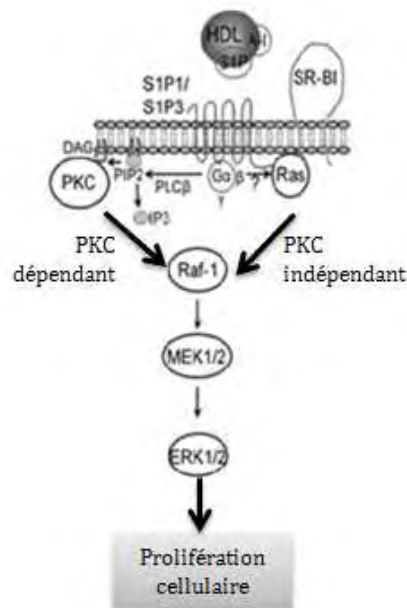


Figure 16 : Représentation schématique de la signalisation SR-BI dépendante responsable de la prolifération cellulaire. D'après (Vassilis Zannis, Kateifides, Fotakis, Zanni, & Kardassis, 2012).

Les HDL sont de plus considérées comme mitogènes pour les cellules musculaires lisses (CML) ce qui semble paradoxal étant donné le rôle délétère de la prolifération des CML dans le processus athéromateux. Cependant, cet effet mitogène n'est rencontré qu'à de fortes doses qui ne sont pas celles des conditions physiologiques du liquide interstitiel. Ces concentrations ne sont retrouvées qu'après rupture de la barrière endothéliale, l'effet mitogène des HDL sur les CML pourrait alors contribuer à la stabilité de la plaque en empêchant la sénescence et l'apoptose de ces cellules (J. Nofer *et al*, 2002).

d. Activité anti-inflammatoire :

Considérée comme une maladie inflammatoire chronique, une des étapes initiales de la constitution de la plaque d'athérome est le recrutement et la liaison des monocytes à l'endothélium. Comme nous l'avons déjà vu, les cellules endothéliales activées expriment de nombreuses molécules d'adhésion telles VCAM-1 ou ICAM-1 qui lient les monocytes. Ces derniers peuvent ensuite migrer dans l'espace sous-endothélial sous l'influence de MCP-1 un des acteurs clés de leur recrutement (HDL forum, n.d.). Les HDL jouent de multiples rôles dans l'inflammation tels que l'inhibition de l'expression induites par les cytokines de molécules d'adhésion par les cellules endothéliales, l'inhibition de l'adhésion des monocytes

à l'endothélium ainsi que leur activation, la réduction de l'activation des polynucléaires neutrophiles ou encore leur infiltration dans le mur artériel (Camont *et al*, 2011). Dans les **cellules endothéliales**, les HDL peuvent inhiber, à doses physiologiques, l'induction de manière dose-dépendante des molécules d'adhésion (ICAM-1, VCAM-1, E-sélectine) par le TNF α et l'interleukine-1 (Cockerill, Rye, Gamble, Vadas, & Barter, 1995). Ce processus fait appel à l'activation de SR-BI, sa protéine adaptatrice PDZK1, PI3K et eNOS (Kimura *et al*, 2006). D'autres récepteurs endothéliaux sont aussi impliqués dans cet effet anti-inflammatoire puisque les cellules endothéliales de souris invalidées pour ABCG1 expriment plus fortement la E-sélectine ou ICAM-1 et sécrètent également plus d'interleukine-6 et MCP-1 (Whetzel *et al*, 2010). Les HDL agissent aussi directement sur l'activation des monocytes/macrophages et des polynucléaires neutrophiles. L'équipe de Chin-Dusting a tout d'abord mis en évidence que les HDL humaines diminuent l'expression de CD11b (une intégrine impliquée dans l'adhésion vasculaire) à la membrane de **monocytes** isolés de sang total humain. De façon intéressante, cet effet est essentiellement lié à l'apoA-I et est aboli lors du blocage d'ABCA1 avec un anticorps. (A. J. Murphy *et al*, 2008). Cette même équipe a depuis montré *in vitro* que l'apoA-I (*via* ABCA1) et les HDL (*via* SR-BI) ont le même effet sur l'expression de CD11b chez les **polynucléaires neutrophiles**. Cela a été confirmé chez l'homme où une perfusion de HDL reconstituées chez des patients souffrant de maladies vasculaires périphériques est responsable d'une diminution significative de l'expression de CD11b et donc de l'activation de ces leucocytes. Il y avait d'autre part une corrélation significative entre l'abondance en radeaux lipidiques et l'expression de CD11b lors des tests *in vitro* (mais pas avec l'efflux de cholestérol) (A. J. Murphy *et al*, 2011). Puisque le rôle d'ABCA1 et d'ABCG1 dans le transport du cholestérol ne fait plus de doute, la présence d'un lien mécanistique entre efflux de cholestérol et propriétés anti-inflammatoires des HDL semble exister. C'est ce qui est peu à peu démontré, notamment dans les macrophages. L'interaction apoA-I-ABCA1 stimule en même temps que la sortie de cholestérol, l'activation de molécules de signalisation telles que la Janus Kinase 2 (JAK2) qui stimule lui-même la protéine STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3). Cette interaction apoA-I/ABCA1 s'accompagne d'une moindre synthèse de cytokines inflammatoires (interleukine-1 β , interleukine-6, TNF α) suite à l'ajout de LPS, ce phénomène étant réversé lors de l'extinction de STAT3 ou d'ABCA1 (Tang, Liu, Kessler, Vaughan, & Oram, 2009). Une fois

phosphorylé, STAT3 actif pourrait transloquer vers le noyau où il pourrait activer la transcription de gènes codant des protéines anti-inflammatoires (Gordon, Hofmann, Askew, & Davidson, 2011). À côté de cela, il ne faut pas oublier que les HDL, en hydrolysant les lipides oxydés par la PAF-AH et la PON-1 exercent aussi leur effet anti-inflammatoire puisque les phospholipides oxydés peuvent déclencher une inflammation au niveau de la paroi artérielle (Kontush & Chapman, 2006).

e. Activité anti-thrombotique :

De récentes données cliniques ont permis de lier dyslipoprotéïnémie et thrombose veineuse avec notamment un lien entre taux élevés de HDL-C et faible risque de thrombose veineuse (femmes ménopausées, (Doggen *et al*, 2004)) et inversement, des taux bas de HDL-C ont été retrouvés associés à un risque accru de thrombose veineuse (homme <55 ans, (Hiroshi Deguchi, Pecheniuk, Elias, Averell, & Griffin, 2005)). De nombreux mécanismes semblent intervenir dans cette protection puisque les HDL agiraient aussi bien lors de l'hémostase primaire que lors de la coagulation ou de la fibrinolyse, certaines de leurs actions étant liées aux protéines qu'elles transportent (cf. paragraphe sur la structure des HDL). Les premières études ont d'abord montré que les HDL peuvent stimuler la synthèse de prostacycline par des cellules endothéliales de porc ou humaines en culture (Fleisher *et al*, 1982; Tamagaki *et al*, 1996). Ce relargage est bénéfique puisque la **prostacycline** est un puissant inhibiteur endogène de l'agrégation plaquettaire (via son récepteur de haute affinité situé à la surface plaquettaire) mais aussi un vasodilatateur fort qui inhibe la croissance des cellules musculaires lisses. Elle peut également empêcher l'adhésion des plaquettes et des leucocytes à la surface endothéliale (Michelson, 2007). L'effet antiagrégant passerait aussi par un effet direct sur les plaquettes par deux voies d'inhibition différentes : il y aurait d'une part activation du récepteur LRP8 (*via* la liaison de l'apoE) et d'autre part liaison sur un ou plusieurs autre(s) récepteurs tels que la glycoprotéine IIb/IIIa ou CD36 (indépendamment de l'apoE). Ces deux chemins aboutissant à l'activation de l'oxyde nitrique synthase et à l'inhibition de l'activation plaquettaire (J. Nofer *et al*, 2002). L'augmentation de NO biodisponible empêchant alors le relargage des corps de Weibel-Palade (contenant de facteur von Willebrand) interférant ainsi avec les étapes suivantes d'hémostase (Mineo & Shaul, 2012b).

Concernant l'effet anticoagulant, plusieurs pistes sont évoquées. *In vitro*, les HDL peuvent augmenter l'inactivation de la protéine Va par la protéine C activée et la protéine S (responsables de l'inactivation protéolytique des facteurs Va et VIIIa de la coagulation) (Griffin, Kojima, Banka, Curtiss, & Fernández, 1999). Il a également été montré que certains glycosphingolipides neutres (transportés notamment par les HDL) sont des cofacteurs lipidiques de la protéine C activée et de la protéine S (Hiroshi Deguchi, Fernández, & Griffin, 2002). Un taux bas de glucosylcéramide a d'ailleurs été retrouvé chez un nombre significatif de patients souffrant de thrombose veineuse par rapport à leurs contrôles (H. Deguchi, 2001). Cette même équipe a également montré *in vitro* que la sphingosine (transportée par les HDL) peut diminuer la génération de thrombine à la surface plaquettaire en empêchant les interactions procoagulantes entre les facteurs Va et Xa (Hiroshi Deguchi, Yegneswaran, & Griffin, 2004).

Enfin, les HDL agiraient sur la fibrinolyse en diminuant l'expression de l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1 (PAI-1) et en augmentant l'expression de l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA) dans des cultures de cellules endothéliales (Vassilis Zannis et al., 2012). Un ensemble des propriétés anti-thrombotiques des HDL est représenté figure 17.

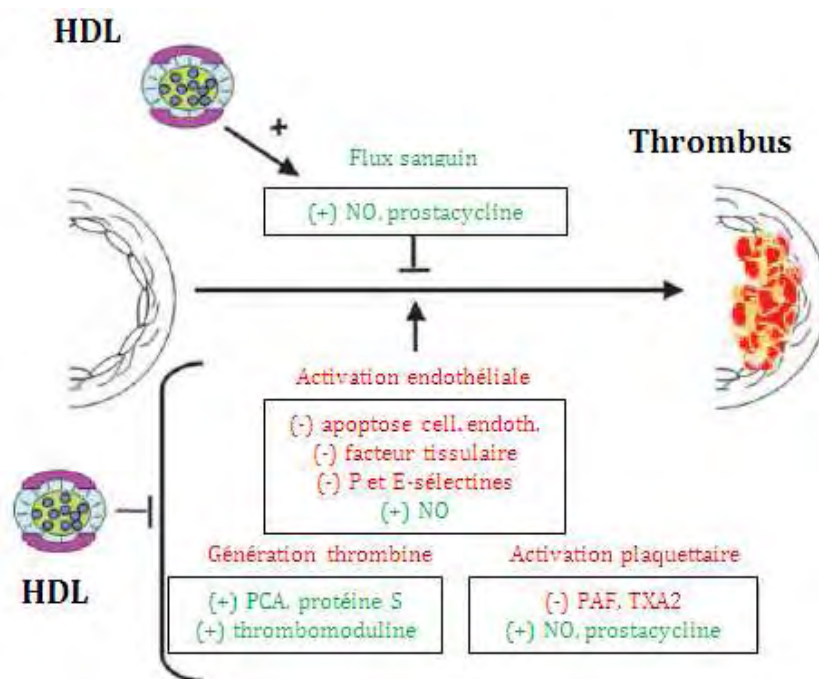


Figure 17 : Effets anti-thrombotiques des HDL. Les HDL augmentent le flux sanguin via la production de NO et de prostacycline. Les cellules endothéliales (cell endoth) sont également moins activées avec une moindre apoptose, l'inhibition du facteur tissulaire, une

moins grande expression des molécules d'adhésion telles que la P et E-sélectines ainsi que la génération de NO. Les HDL permettent aussi de diminuer la génération de thrombine en augmentant les activités de la protéine C activée (PCA) et de la protéine S, elles permettent aussi d'augmenter la production de thrombomoduline endothéliale. L'antagonisme des HDL sur les plaquettes entraîne une diminution de la synthèse du Platelet-Activating Factor (PAF) et du thromboxane A2 (TXA2) ainsi qu'une augmentation de synthèse du NO et de la prostacycline. D'après (Mineo *et al*, 2006).

f. Rôle dans le système immunitaire et propriétés anti-infectieuses :

A côté des grandes propriétés athéroprotectrices des HDL, il est intéressant de noter que ces lipoprotéines possèdent d'autres effets pléiotropes tel qu'un rôle dans le système immunitaire. Le rôle émergent des HDL comme acteur de ce système a récemment été mis en lumière par une revue résumant l'ensemble de leurs propriétés (Norata, Pirillo, Ammirati, & Catapano, 2012). Tout d'abord, les HDL interviennent dans l'**immunité innée**. En déplaçant les cellules périphériques en cholestérol, les HDL diminuent le contenu en cholestérol des rafts lipidiques perturbant ainsi la présentation des antigènes. Les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de type II sont en effet localisées dans ces structures riches en lipides et un nombre suffisant est requis pour l'activation des lymphocytes T. Une désorganisation de ces microdomaines membranaires peut ainsi inhiber l'activation des lymphocytes. Nous avons également vu que les analyses protéomiques ont révélé que les particules HDL pouvaient transporter plusieurs protéines impliquées dans l'activation du complément (Rezaee, Casetta, Levels, Speijer, & Meijers, 2006; Vaisar *et al*, 2007)(Green *et al*, 2009). Curieusement, les HDL des sujets sains sont enrichies en protéines du complément telles que C4a, C4b, C9 (Vaisar *et al*, 2007) alors qu'*in vitro*, il a été montré que les HDL bloquent l'assemblage du complexe d'attaque du complément (Norata *et al*, 2012; S. I. Rosenfeld, Packman, & Leddy, 1983). Norata *et al* avancent l'hypothèse que les HDL pourraient lier certaines fractions du complément pour en accélérer la clairance et réguler ainsi l'activation du système du complément. De nombreuses études ont par ailleurs montré le rôle bénéfique des HDL dans des modèles animaux d'endotoxémie. Par exemple, la surexpression chez des souris de l'apoA-I humaine diminue la réponse inflammatoire induite par le **lipopolysaccharide** bactérien (LPS, constituant de la membrane externe des bactéries gram négatif) avec une baisse significative des taux sériques de TNF α , d'IL-6 et IL-1 β ainsi qu'une protection contre l'atteinte multiviscérale (Y. Li, Dong, & Wu, 2008). L'interaction

directe de l'apoA-I avec ce LPS des bactéries gram négatif joue un rôle majeur dans la lutte contre les infections en accélérant la clairance hépatique des bactéries tout en empêchant l'activation cellulaire induite par l'endotoxine (Camont *et al*, 2011). L'apoA-I est de plus efficace pour se lier aux **entérohémolysines** (sécrétées par *E. coli*) et aux **acides lipoteichoïques** (constituants de la paroi des bactéries à gram positif) (Gordon *et al*, 2011). Ces lipoprotéines sont également capables d'avoir un effet **antiviral** dont le mécanisme précis n'est pas clairement compris. Il est d'ailleurs intéressant de voir que parmi les partenaires des HDL, SR-BI est impliqué dans l'entrée du virus de l'hépatite C dans les cellules hépatiques (Catanese *et al*, 2010). Enfin, l'effet le mieux démontré semble être le rôle anti-parasitaire des HDL lors de l'infection par *Trypanosoma brucei brucei* puisque l'**apoL-I** a été découverte en 2003 comme étant le **facteur trypanolytique humain** (Vanhamme *et al*, 2003). Comme expliqué par Wheeler RJ (Wheeler, 2010), il existe deux sous-classes de facteur trypanolytique : le Trypanolytic Factor 1 (TLF1) dans la fraction des HDL3 et le TLF2 dans une fraction plus dense. Le TLF1 en particulier, serait constitué d'apoL-I en faible quantité, d'haptoglobine related protein (Hpr) et d'hémoglobine. L'entrée de ces complexes dans le parasite se ferait par deux types de récepteurs : un récepteur de haute affinité en faible nombre de copies qui lie entre autres les complexes Hpr-hémoglobine et un récepteur de basse affinité mais présent en grande quantité qui serait un récepteur scavenger aux lipoprotéines mais dont l'identité est inconnue. Après capture du TLF, le faible pH lysosomal permet à l'apoL-I de former des pores dans sa membrane entraînant ainsi un influx de chlore. Il y a ainsi un déséquilibre dans la balance osmotique responsable d'un gonflement du lysosome puis de la mort cellulaire.

Du côté de l'**immunité adaptative**, le lien avec les lipoprotéines a été soulevé car les récepteurs clés des lymphocytes B et T (BCR et TCR) sont localisés dans les rafts lipidiques, leur activité est ainsi modulée par les compositions et structures de ces rafts. D'autre part, la différenciation des cellules T est sous le contrôle des lysosphingolipides et notamment la sphingosine-1-phosphate. Une synthèse de ces différentes activités est présentée figure 18.

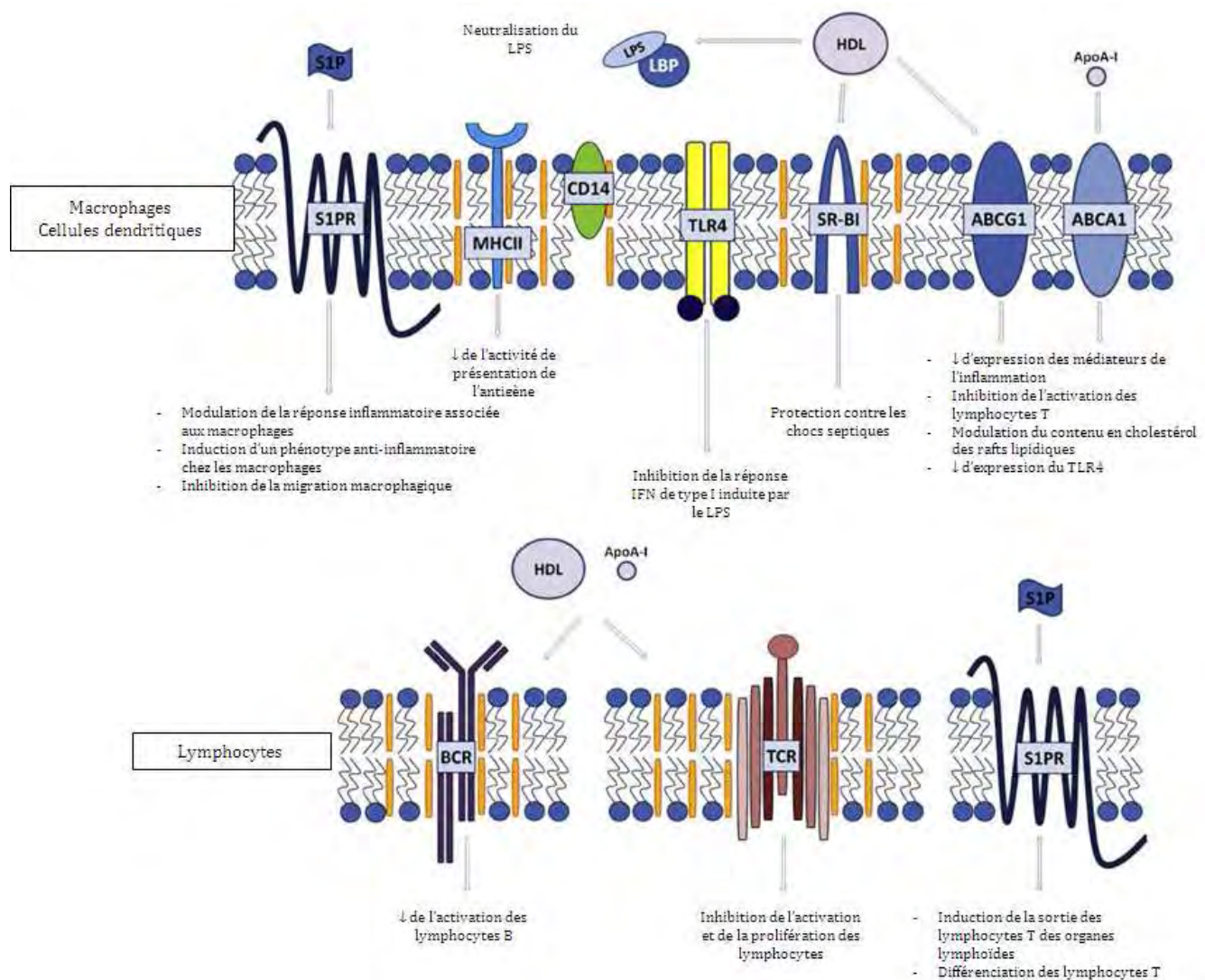


Figure 18 : Les HDL et les différents types de réponse. La déplétion en cholestérol des rafts lipidiques suivie de l'interaction des HDL avec ses récepteurs clés (SR-BI, ABCA1, ABCG1) modulent l'activité et les fonctions des cellules de l'immunité innée et adaptative. La déplétion en cholestérol impacte également la compartimentalisation des molécules de signal lors des différents stages d'activation des lymphocytes B, notamment sur le BCR. Cette désorganisation s'accompagne alors d'une moins bonne initiation de la transduction par le BCR et par une moindre endocytose des complexes BCR-antigènes. D'après (Norata *et al*, 2012).

g. Homéostasie du glucose :

Alors qu'un taux plasmatique bas de HDL-C constitue un facteur de risque coronarien, de nouvelles données suggèrent également qu'il interviendrait dans la physiopathologie du diabète de type II (Drew, Rye, Duffy, Barter, & Kingwell, 2012). En effet, alors que l'on connaît l'impact du diabète et de l'insulinorésistance sur le bilan lipidique et notamment sur les HDL

(figure 19), l'effet protecteur des HDL sur l'homéostasie du glucose n'a pas été démontré avec certitude.

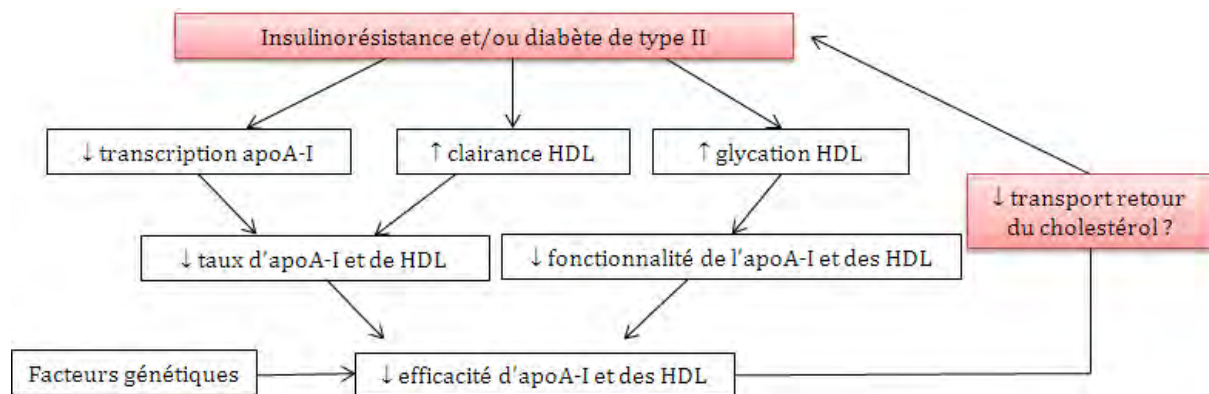


Figure 19 : Mécanismes affectant les taux et fonctions d'apoA-I et de HDL dans le diabète de type II. Une relation bidirectionnelle existe entre une faible fonctionnalité des HDL et une altération du contrôle glycémique. La baisse de la transcription d'apoA-I dans le foie a été montrée chez les rongeurs et l'impact sur le transport retour du cholestérol reste toujours à démontrer. D'après (Drew *et al*, 2012).

Les données expérimentales ont tout d'abord montré chez des souris que l'inactivation sélective d'ABCA1 dans les cellules β du pancréas induit une altération de la tolérance au glucose ainsi qu'une moins bonne insulinosécrétion malgré une insulinosensibilité normale (Liam R Brunham *et al*, 2007). L'inactivation à la fois d'ABCA1 et d'ABCG1 dans les cellules β est également responsable d'une glycémie à jeun plus élevée ainsi que d'une inflammation accrue. Une plus forte expression d'interleukine-1 β (cytokine pro-inflammatoire) et une plus grande infiltration macrophagique sont constatées dans les îlots de ces souris par rapport à leurs contrôles (Kruit *et al*, 2012). L'homéostasie du cholestérol *in vivo* est donc fondamentale pour la fonction β comme le montre la contribution de ces deux transporteurs qui régulent le contenu cellulaire en cholestérol. Enfin, malgré l'ajout d'agents de stress tels que des concentrations élevées en glucose ou de la thapsigargine, les HDL sont également capables d'empêcher la mort des cellules β en maintenant la fonctionnalité du réticulum endoplasmique. Le(s) récepteur(s) responsables de ces effets anti-apoptotiques dans ce type cellulaire ne sont toutefois pas connus (Pétremand *et al*, 2012). D'autre part, l'administration intra-veineuse d'HDL reconstituées (rHDL) à des diabétiques de type II est responsable d'une diminution de la glycémie. Celle-ci est secondaire à l'augmentation de l'insulinémie mais aussi à l'activation de la voie de l'AMP-

activated protein kinase (AMPK) dans le muscle squelettique (Drew et al., 2009). L'activation de cette voie de l'AMPK associée à la phosphorylation de l'acétylcoenzyme A carboxylase (ACC) a également été décrite sur des lignées de myocytes humains en culture (C2C12) après ajout d'apoA-I confirmant ainsi la captation du glucose par le muscle squelettique (Han et al, 2007). L'effet bénéfique des HDL sur la glycémie pourrait être secondaire à une augmentation des taux d'adiponectine puisque le transfert du gène de l'apoA-I chez la souris s'accompagne d'une augmentation des concentrations plasmatiques de cette adipokine et il en est de même dans le gras abdominal. Cette augmentation d'expression est également retrouvée lorsque des adipocytes en culture sont traités par des HDL (Mineo & Shaul, 2012b). Dalla-Riva et al ont par la suite montré que les acides aminés 190 à 243 de l'apoA-I libre sont responsables d'une augmentation de l'expression de GLUT4 à la membrane des cellules musculaires promouvant ainsi la captation du glucose, la voie de signalisation de l'AMPK étant également activée (Dalla-Riva, Stenkula, Petrlova, & Lagerstedt, 2013). L'ensemble des mécanismes potentiels est résumé dans la figure 20 ci-dessous.

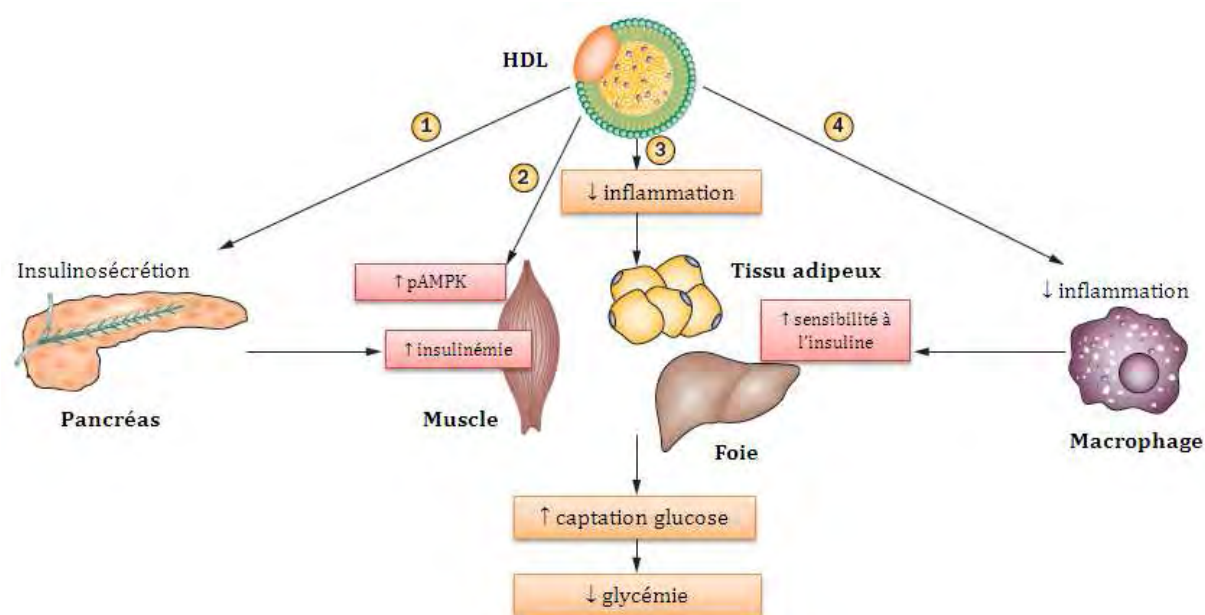


Figure 20 : Mécanismes potentiels de régulation de l'homéostasie glucidique par les HDL. 1- régulation de l'insulinosécrétion. 2- augmentation de la captation de glucose par le muscle et d'autres tissus périphériques *via* des mécanismes indépendants de l'insuline (phosphorylation de l'AMPK). 3- amélioration de la sensibilité périphérique à l'insuline par effet anti-inflammatoire dans différents tissus (tissu adipeux, muscle, foie). 4- diminution de l'inflammation dans les macrophages. pAMPK : AMP-activated protein kinase phosphorylée. D'après (Drew et al, 2012).

Une preuve intéressante du lien entre élévation des taux de HDL *in vivo* et amélioration du statut glucidique a été montrée lors de l'analyse des résultats de l'essai clinique ILLUMINATE. La molécule étudiée lors de cet essai était le torcetrapib, un inhibiteur de la CETP, responsable de très fortes augmentations des taux de HDL mais également responsable d'une plus forte mortalité chez les sujets traités expliquant l'arrêt de l'étude. Chez plus de 6600 diabétiques de type II inclus dans cet essai, ceux traités par le torcetrapib avaient des glycémies au bout de trois mois plus basses de 0.34 mmol/L ainsi qu'une insulïnémie plus faible de 11.7 μ U/mL par rapport à l'autre bras de l'étude ($p < 0.001$ pour les deux paramètres). Au bout de six mois de traitement, l'hémoglobine glyquée était également significativement différente entre les deux groupes (7.29% contre 7.06%) (Philip J Barter *et al*, 2011). D'autres inhibiteurs de la CETP étant en cours d'étude, il sera intéressant de voir leur impact chez les diabétiques sur le contrôle glycémique.

h. Lien avec l'obésité :

Avant de parler du lien entre obésité et HDL, il convient de faire un bref rappel des différents types de tissu adipeux. Le tissu adipeux blanc est responsable du stockage des lipides qu'il ne brûle pas. Outre le noyau et les organelles classiques, l'adipocyte blanc renferme une seule gouttelette (ou vacuole) lipidique occupant tout le cytoplasme. Le tissu adipeux brun est quant à lui actif dans la dégradation des lipides qu'il utilise pour produire de la chaleur. Retrouvé chez les mammifères hibernants et les bébés, il est également présent chez l'adulte où il se situe le long de la colonne vertébrale et sous les clavicules. Les adipocytes bruns contiennent, au contraire des blancs, plusieurs gouttelettes de graisse et un grand nombre de mitochondries. Ces adipocytes sont en effet capables d'oxyder des substrats et ils possèdent une protéine spécifique qui est l'UCP1 ou protéine découplante mitochondriale. Cette protéine est responsable du découplage de la respiration mitochondriale ce qui permet ainsi d'oxyder les acides gras et de produire de la chaleur au lieu de synthétiser de l'ATP (<http://www.ladocumentationfrancaise.fr/var/storage/rapports-publics/054000303/0000.pdf>). Ruan X *et al* (Ruan *et al*, 2011) ont montré que des souris soumises à un régime riche en gras et qui surexpriment l'apoA-I, ou à qui on donne un peptide mimétique de l'apoA-I (D-4F), présentent une diminution de leur masse grasse blanche ainsi qu'une augmentation de leurs dépenses énergétiques. Le niveau protéique

d'UCP1 est également augmenté dans le tissu adipeux brun de chacune de ces souris et on assiste à une augmentation de la phosphorylation d'AMPK dans des adipocytes bruns en culture. Ces résultats montrent donc, chez la souris, un effet potentiellement anti-obésité de l'apoA-I. Concernant maintenant l'homme et un aspect physiologique tout à fait différent, l'autophagie est augmentée dans le tissu adipeux de sujets obèses, particulièrement dans le tissu omental et corrèle avec le degré d'obésité (Kovsan *et al*, 2011). Ce processus correspond à une dégradation des macromolécules cytoplasmiques et d'organelles *via* la voie lysosomale. Ce rôle est important dans la mesure où il permet d'éliminer les protéines agrégées ou mal repliées ainsi que les organelles endommagées ou les pathogènes intracellulaires. Toutefois, le lien entre autophagie et obésité est peu clair même s'il pourrait s'agir d'un mécanisme de survie pour les adipocytes au sein d'un stroma riche en cellules ou bien d'un processus sous-jacent la mort d'adipocytes hypertrophiés (S. Wang & Peng, 2012). Il est connu qu'une perte d'autophagie dans les pré-adipocytes affecte le processus de différenciation des adipocytes blancs et entraîne la formation d'adipocytes semblables à des adipocytes bruns (« brown-like ») dégradant les acides gras et plus sensibles à l'insuline. Dans ce contexte, Wang et Peng (S. Wang & Peng, 2012) avancent que les HDL et l'apoA-I peuvent inhiber l'autophagie à travers la signalisation PI3K-Akt modifiant ainsi le processus de différenciation expliquant ainsi leurs effets positifs anti-obésité et sur l'insulinosensibilisation (figure 21).

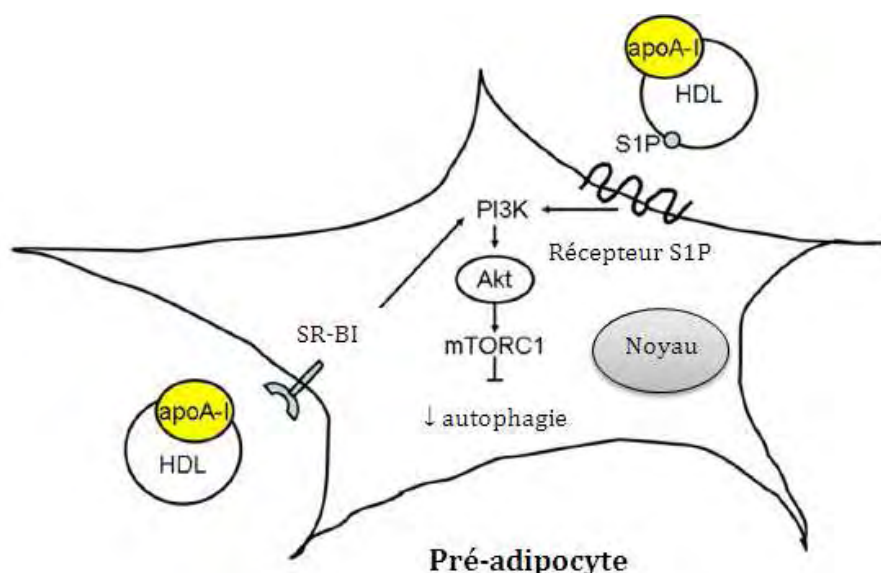


Figure 21 : Effet des HDL/apoA-I sur l'autophagie dans les pré-adipocytes. L'activation de la voie PI3K/Akt se fait via l'activation de SR-BI ou du récepteur à la sphingosine-1-phosphate. Akt activée régule positivement l'activité du complexe mTORC1 comprenant la sérine/thréonine kinase mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) et qui est connue pour inhiber le processus d'autophagie. D'après (S. Wang & Peng, 2012).

i. Transport des miRNA :

Le mécanisme exact de chargement des miRNA sur les HDL n'est toujours pas connu mais la sphingomyélinase neutre de type 2 pourrait le réguler. En revanche, la délivrance aux cellules cibles est mieux décrite et serait médiée par SR-BI qui les protégerait de la dégradation lysosomale (Vickers *et al*, 2011). Cette même équipe a par ailleurs montré que le profil des miRNA portés par les HDL est significativement différent entre les sujets contrôles et les sujets hypercholestérolémiques soulignant ainsi le rôle potentiel de biomarqueur de cette nouvelle classe. Cette nouvelle propriété sort donc les HDL de leur rôle classique et met en avant la complexité de leur métabolisme *via* sa fonction de modulateur d'expression génique.

D) Article sur les HDL-thérapies :

Dans le cadre de ce travail, nous avons eu l'opportunité de rédiger un article sur l'état des lieux des thérapeutiques ciblant les HDL. Celui-ci a récemment été accepté dans Archives of Cardiovascular Diseases (ACVD, Société française de Cardiologie) et est présenté ci-après. Malgré l'avancée des nouvelles thérapeutiques, il persiste toujours un risque résiduel qui ne

peut être totalement éliminé par l'adjonction de plus fortes doses de statines ou de la combinaison des différentes thérapeutiques que nous avons vues précédemment. C'est pourquoi un des principaux axes de recherche a été d'augmenter les taux de HDL-C afin de bénéficier de leurs effets athéroprotecteurs. Parmi les principales molécules utilisées ou à l'étude, figurent l'acide nicotinique et les inhibiteurs de la CETP. L'acide nicotinique (ou niacine) a longtemps été utilisée en raison de sa forte capacité à augmenter les taux de HDL-C. Toutefois, en raison de ses effets indésirables gênants (à type de flush cutané), différentes formulations ont été synthétisées (formes à libération prolongée ou adjonction d'un inhibiteur de prostaglandines). Celles-ci ont ensuite été étudiées dans deux récentes études : AIM-HIGH (Atherosclerosis Intervention in Metabolic Syndrome with Low HDL/HighTriglycerides and Impact on Global Health Outcomes) et HPS2-THRIVE (Heart Protection Study 2-Treatment of Highdensity lipoprotein to Reduce the Incidence of Vascular Events). Ces deux études ont comparé l'adjonction de niacine à une prise seule de statine. La première étude a été arrêtée avant la fin prévue en raison d'une absence de réduction sur la survenue des événements cardio-vasculaires mais aussi d'une augmentation non significative des accidents vasculaires cérébraux ischémiques. La deuxième étude a également été stoppée en raison d'une inefficacité à atteindre les premiers objectifs (réduction des chocs et des attaques cardiaques) mais aussi d'une augmentation significative des effets indésirables sérieux. Concernant les inhibiteurs de la CETP, plusieurs molécules ont vu le jour, c'est le cas du dalcétrapib, de l'anacétrapib et de l'évacétrapib. Concernant le dalcétrapib, différents essais ont été programmés (dal-VESSEL et dal-PLAQUE) mais l'essai dal-OUTCOME a mis fin aux espoirs de commercialisation puisque cet essai a été arrêté en raison d'un manque d'efficacité. Concernant l'évacétrapib, des phases II et III ont récemment débuté afin de démontrer son efficacité et son innocuité. L'anacétrapib est lui aussi en cours d'étude avec deux grands essais (le DEFINE trial et le REVEAL HSP-3-TIMI) qui devraient permettre de conclure quant à l'efficacité de ces inhibiteurs de CETP. On pensait en effet initialement qu'ils permettraient d'abaisser le risque cardio-vasculaire de façon aussi spectaculaire qu'ils étaient capables d'augmenter les taux de HDL-C. Cependant, les résultats obtenus avec les premières molécules synthétisées ont mis à mal cette hypothèse et soulèvent la problématique de savoir si la HDL-thérapie est un concept viable ou pas, ou tout au moins, mettent en avant la complexité de cette cible. Faut-il en effet augmenter les

taux de HDL-C quitte à perturber leur équilibre et altérer leurs propriétés pléïotropes ou ne faut-il agir que sur leurs propriétés pléïotropes (anti-oxydante et anti-inflammatoires par exemple), annexes à leur fonction dans le transport retour du cholestérol, et qui pourraient finalement être plus importantes que l'épuration du cholestérol cellulaire excédentaire? La revue présentée ci-dessous intitulée « Les HDL comme cible thérapeutique : état des lieux », à laquelle j'ai contribué, discute de manière plus approfondie de ces différentes questions (Verdier *et al.*, 2013).



Available online at
SciVerse ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com/en



REVIEW

Targeting high-density lipoproteins: Update on a promising therapy



Les HDL comme cible thérapeutique : état des lieux

Céline Verdier^{a,b}, Laurent O. Martinez^b,
Jean Ferrières^{c,d}, Meyer Elbaz^{b,c},
Annelise Genoux^{a,b}, Bertrand Perret^{a,b,*}

^a CHU Toulouse, Department of Biochemistry, Toulouse, France

^b Inserm, UMR 1048, Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires de Toulouse, Université de Toulouse III, Toulouse, France

^c CHU Toulouse, Department of Cardiology, Toulouse, France

^d Inserm UMR 1027, Épidémiologie et Analyses en Santé Publique, Université de Toulouse III, Toulouse, France

Received 15 March 2013; received in revised form 25 June 2013; accepted 27 June 2013
Available online 25 September 2013

KEYWORDS

HDL-therapy;
CETP inhibitor;
Niacin;
Mimetic peptides;
ApoA-I transcription

Summary Numerous epidemiological studies have demonstrated the atheroprotective roles of high density lipoproteins (HDL), so that HDL is established as an independent negative risk factor. The protective effect of HDL against atherosclerosis is mainly attributed to their capacity to bring peripheral excess cholesterol back to the liver for further elimination into the bile. In addition, HDL can exert other protective functions on the vascular wall, through their anti-inflammatory, antioxidant, antithrombotic and cytoprotective properties. HDL-targeted therapy is thus an innovative approach against cardiovascular risk and atherosclerosis. These pleiotropic atheroprotective properties of HDL have led experts to believe that “HDL-related therapies” represent the most promising next step in fighting against atherosclerosis. However, because of

Abbreviations: ABCA1, Adenosine triphosphate binding cassette A1; ABCG1, Adenosine triphosphate binding cassette G1; apo, Apolipoprotein; ATP, Adenosine triphosphate; CETP, Cholesteryl ester transfer protein; CVD, Cardiovascular disease; HDL, High-density lipoprotein; HDL-C, High-density lipoprotein cholesterol; LCAT, Lecithin cholesterol acyl transferase; LDL, Low-density lipoprotein; LDL-C, Low-density lipoprotein cholesterol; LXR, Liver X receptor; P2Y₁₃, Purinergic receptor 13; PPAR, Peroxisome proliferator-activated receptor; RCT, Reverse cholesterol transport; SR-BI, Scavenger receptor class B type I; VLDL, Very-low-density lipoprotein.

* Corresponding author. Laboratoire de Biochimie Purpan, Institut Fédératif de Biologie, 330, avenue de Grande-Bretagne, TSA 40031, 31059 Toulouse Cedex 09, France. Fax: +33 5 67 69 03 77.

E-mail addresses: bertrand.perret@inserm.fr, perret.b@chu-toulouse.fr (B. Perret).

MOTS CLÉS

HDL-thérapie ;
Inhibiteurs de CETP ;
Acide nicotinique ;
Peptides
mimétiques ;
Régulation
transcriptionnelle de
l'apo A-I

the heterogeneity of HDL functions, targeting HDL is not a simple task and HDL therapies that lower cardiovascular risk are NOT yet available. In this paper, an overview is presented about the therapeutic strategies currently under consideration to raise HDL levels and/or functions. Recently, clinical trials of drugs targeting HDL-C levels have disappointingly failed, suggesting that HDL functions through specific mechanisms should be targeted rather than increasing per se HDL levels.

© 2013 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Résumé Le rôle athéroprotecteur des lipoprotéines de haute densité (HDL) est maintenant largement démontré par les études épidémiologiques. Cet effet bénéfique est principalement attribué à la fonction des HDL dans le transporteur retour du cholestérol, des cellules périphériques, notamment les macrophages de la paroi artérielle, vers le foie, où il est ensuite éliminé via les voies biliaires. En outre, a été démontré que les HDL possèdent de nombreux effets pléiotropes telles que des activités anti-inflammatoires, anti-oxydantes, anti-thrombotiques ou cyto-protectrices. Cibler spécifiquement les HDL pourrait constituer une approche innovante dans la lutte contre l'athérosclérose et le risque cardiovasculaire. Cependant, en raison de l'hétérogénéité de leurs fonctions, cibler les HDL n'est pas un objectif simple. Cet article vise à présenter les stratégies actuellement à l'étude, celles-ci ayant pour objectif, soit d'augmenter les concentrations circulantes de HDL-cholestérol (HDL-C), soit de moduler les fonctions de ces lipoprotéines. Des essais cliniques récents, portant sur des molécules augmentant les taux de HDL-C, n'ont pas permis de conclure de manière claire à une efficacité dans la réduction du risque cardiovasculaire. Cela semble donc suggérer que ce sont les fonctions des HDL qui devraient être ciblées plutôt que simplement l'élévation de leur concentration.

© 2013 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Background

Cardiovascular pathologies are now considered as the biggest scourge of our modern society; during 2008, nearly 30% of deaths worldwide were due to cardiovascular diseases (CVDs) [1]. At the origin of most cardiovascular pathologies, atherosclerosis is a deleterious phenomenon responsible for coronary artery diseases, peripheral vascular diseases and strokes. This inflammatory process is characterized by alteration of the arterial wall, followed by lipid infiltration leading to thickening of the atheroma plaque and then, ultimately, to its rupture with the formation of a thrombus. Cholesterol deposit is crucial and two main lipoproteins are able to transport cholesterol in the plasma: while increased low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) concentration is among the main risk factors for CVDs, high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) concentration is inversely related to atherosclerosis severity. Therefore, these two variables are included in systematic routine measurements to screen dyslipidaemias in the general population, but also to set therapeutic objectives. Lowering LDL-C, known to be responsible for cholesterol deposition in the vessel wall, has always been one of the most attractive targets of lipid-lowering drugs. Indeed, statin therapy has a beneficial effect on the atherosclerotic process and a 12% reduction in overall mortality has been observed for each mmol/L decrease in LDL-C concentration (40 mg/dL) [2]. Unfortunately, the residual risk remains important, which emphasizes the need to find new targets to achieve further benefits. Among all possibilities, raising HDL-C concentration has appeared as a most promising strategy. Indeed, epidemiological studies have shown that a 0.03 mmol/L (1 mg/dL) reduction in HDL-cholesterol concentration is associated with a 2–3%

increase in cardiovascular risk [3]. And, while a concentration < 1 mmol/L (40 mg/dL) is considered as an independent risk factor for CVD, it has recently been shown that 33% of men and 40% of women treated for dyslipidaemia in Europe display low concentrations of HDL-C [4]. A low HDL-C concentration is therefore very common and strategies aiming at raising the plasma concentration could be promising. In the first part of this review, we will focus on the different protective effects of HDL before addressing treatments that are currently used or under development.

High-density lipoprotein protective mechanisms

Reverse cholesterol transport

Classically, the main HDL atheroprotective function is 'reverse cholesterol transport' (RCT), a process whereby excess cell cholesterol is taken up from peripheral (and vascular foam) cells and is delivered to the liver for further elimination into the bile. To have a better understanding of this process, it is important to be reminded of the structure of HDLs: these are nanoparticles composed of a lipid moiety (free and esterified cholesterol, triglycerides, phospholipids, lysosphingolipids) and a protein part, including the major apolipoprotein A-I (apoA-I) and various enzymes, each one being responsible for numerous beneficial effects. Briefly, after synthesis by the liver, apoA-I acquires phospholipids and free cholesterol through efflux of cellular cholesterol by active (adenosine triphosphate [ATP] binding cassette A1 and G1 [ABCA1, ABCG1]) and passive (scavenger receptor class B type I [SR-BI]) transporters, to form

pre- β HDL. Then, several enzymes carried by HDL itself lead to the formation of mature HDL. Lecithin cholesterol acyl transferase (LCAT) esterifies free cholesterol, leading to migration of esterified cholesterol into the particle core, generating a continuous gradient of free cholesterol from cells towards HDL. After plasma remodelling, HDL-C is taken up by the liver through SR-BI and is eliminated into the bile as free cholesterol or as biliary acids after metabolism.

Another putative pathway involved in RCT has also been evoked. Demonstrated in mice, it is responsible for the uptake of the whole HDL particle and involves activation of the membrane ecto- F_1 -ATPase by apoA-I [5]. The generated adenosine diphosphate further activates the purinergic receptor P2Y₁₃, which in turn stimulates endocytosis of the entire HDL particle [6]. Besides this general process, an alternate route exists in humans for the delivery of HDL-C back to the liver, involving cholesteryl ester transfer protein (CETP); this pathway is quantitatively important in normolipemic conditions. CETP is combined with HDL lipoprotein and mediates transfer of esterified cholesterol towards very-low-density lipoprotein (VLDL) and LDL in exchange for triglycerides. This transfer protein is therefore responsible for a decrease in HDL-C concentration but also accounts for an enrichment of LDL particles in cholesterol, allowing cholesterol elimination by the liver through the LDL receptor. This indirect route that is quantitatively important in humans is absent in rodents, which questions the relevance of murine models for studies on lipoprotein metabolism.

The whole RCT process is therefore physiologically important as it allows removal of excess cholesterol from the artery wall and from atherosclerotic plaques.

Other atheroprotective effects of high-density lipoprotein

Beyond this main atheroprotective mechanism, HDL exerts pleiotropic functions that protect against atherosclerosis (Fig. 1). Indeed, as detailed in different reviews [7,8], HDL can protect endothelium by different mechanisms: by stimulating endothelial cell nitrite oxide and prostacyclin production, HDLs promote better regulation of vascular structure and tone, and thus display antithrombotic and antiaggregating properties [4]. Sphingosine-1-phosphate, a major lysosphingolipid associated with HDL particles, also promotes endothelial survival via activation of its specific receptor. HDLs are also able to decrease endothelial apoptosis induced by tumour necrosis factor- α and growth factor deprivation by several mechanisms and, particularly, through pathways triggered by SR-BI activation, involving proapoptotic factors Bcl-2-associated death promoter and Bcl-2-associated X protein [4] or by apoA-I-mediated ecto- F_1 -ATPase activation [9]. Furthermore, HDLs present potent antioxidative properties due to numerous enzymes carried by these lipoproteins, such as paraoxonase, platelet-activating factor-acetyl hydrolase, LCAT or glutathione selenoperoxidase, which degrade oxidized lipids and therefore prevent LDL oxidation, which is a key determinant of atherogenesis. Apolipoproteins (A-I, A-II, A-IV, E or J) also display antioxidative properties and also have an anti-inflammatory impact. Moreover, HDLs exhibit an anti-infectious role against bacteria and parasites. They protect against endotoxaemia by accelerating bile clearance of gram-negative bacteria due to their binding to membrane lipopolysaccharides, but they also show specific lytic

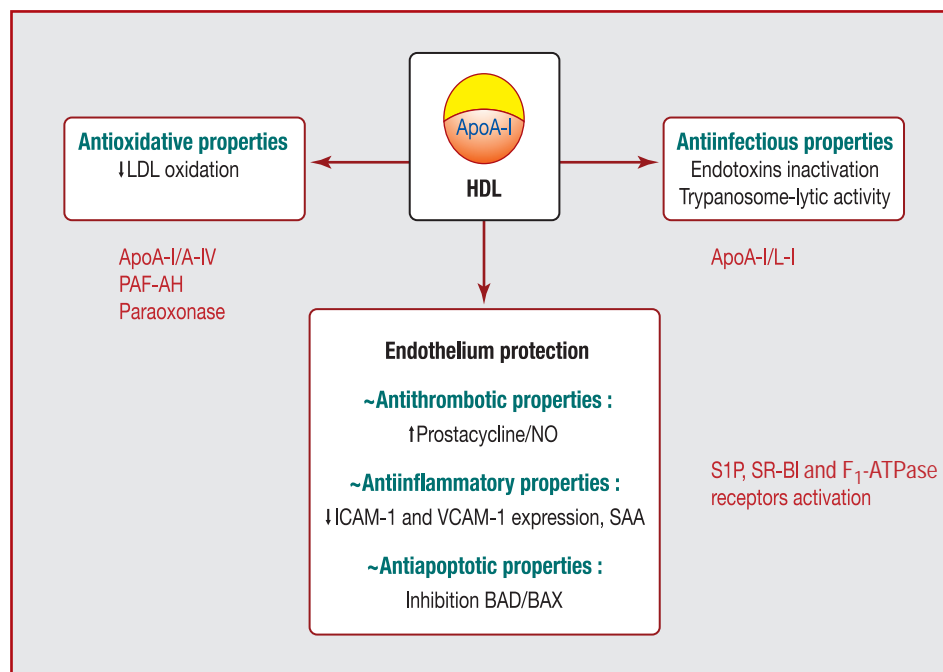


Figure 1. Pleiotropic protective effects of high-density lipoprotein (HDL). Green text indicates pleiotropic effects. Red text indicates HDL components or mechanisms responsible for these biological effects. Apo: apolipoprotein; ATP: adenosine triphosphate; BAD: Bcl-2-associated death promoter; BAX: Bcl-2-associated X protein; ICAM: intercellular adhesion molecule; LDL: low-density lipoprotein; NO: nitric oxide; PAF-AH: platelet-activating factor-acetyl hydrolase; S1P: sphingosine-1-phosphate; SAA: serum amyloid A protein; SR-BI: scavenger receptor class B type I; VCAM: vascular cellular adhesion molecule.

activity against *Trypanosoma brucei brucei*, the sleeping sickness parasite [10]. In addition, HDLs seem to be important in cellular immunity, through macrophage expression of inflammatory chemokines, such as monocyte chemoattractant protein-1. HDLs also promote humoral immunity by modulating activation of the complement system [11].

High-density lipoprotein under inflammatory conditions

HDLs are complex particles, which are continuously remodelled. Systemic inflammation associated with oxidative stress induces structural and compositional modifications. These abnormal HDLs are considered dysfunctional, with loss of their normal properties. Indeed, it has been shown that acute phase proteins, such as serum amyloid A, can displace apoA-I from HDL, causing a negative impact on cholesterol efflux capacity. Modification of HDL composition is also deleterious because of enrichment in triglycerides at the expense of cholesterol esters. Finally, a decrease in antioxidative properties is related to decreased activities of paraoxonase, platelet-activating factor-acetyl hydrolase and LCAT [12]. Furthermore, phospholipase A2, either lipoprotein associated or secreted, has been involved in the inflammatory reaction occurring during atherogenesis. HDLs, due to their anti-inflammatory effects, might counteract actions of phospholipase A2. However, clinical trials using specific phospholipase A2 inhibitors did not show significant effects on HDL or LDL concentrations, as shown by Mohler et al. [13]. Hence, in HDL particles, pro- and anti-inflammatory properties are in subtle equilibrium and some authors have proposed an 'inflammatory index' to quantify HDL properties. This approach assesses either LDL-induced monocyte chemotaxis [14] or dichlorofluorescein oxidation [15], with and without HDL. A ratio between these two conditions allows separation into two groups: a ratio below 1 indicates that HDLs are anti-inflammatory and, conversely, a ratio greater than 1 indicates a proinflammatory profile for HDL. In 2003, a study reported that this index could be more useful than a single measurement of HDL-C for evaluating coronary artery patients: among 26 patients, 77% presented an inflammatory index above 1, while only 11% had a low HDL-C concentration [16]. Unfortunately, these techniques have not been introduced in routine measurements so far, probably because of a lack of standardization.

Modification of HDL composition during acute or chronic inflammation leads to functional alterations; this emphasizes the need to evaluate HDL composition and functions, rather than simple measurement of HDL-C concentration. Therefore, therapies improving HDL functionality could be a more promising bet compared with therapies that only increase concentration.

Pharmacological therapies

Niacin (nicotinic acid)

Niacin, also known as nicotinic acid or vitamin B3, is a physiological precursor of nicotinamide adenine dinucleotide and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, two coenzymes involved in oxidoreductive reactions and energy

metabolism. An inadequate nutritional intake leads to pellagra, an old disease characterized by dermatitis, dementia and diarrhoea. Vitaminic potential is demonstrated with milligram doses, but at a pharmacological dose of approximately 1.5–2 g per day, niacin is one of the most potent agents available for increasing HDL-C concentration. Niacin also reduces all proatherogenic lipids and lipoproteins, including total cholesterol, triglycerides, VLDL, LDL and lipoprotein(a). Different potential mechanisms underlying the antidyslipidaemic effects of niacin have been recently extensively reviewed [17,18] and are summarized in Fig. 2 and Table 1. Beyond its lipid-modifying activity, niacin has also been shown to exert other potential antiatherosclerotic effects, in part through mechanisms involving its receptor (hydroxycarboxylic acid receptor 2 [also called GPR109A]) on immune cells as well as through direct and indirect effects on the vascular endothelium [18]. In accordance with these pleiotropic potentially beneficial actions of niacin in CVDs, its therapeutic use has been considered for decades in the prevention and treatment of atherosclerosis, but negative outcomes of recent clinical trials – discussed below – have led to questions about its efficacy.

Initially, an immediate release form of niacin was used, but was associated with frequent flushes due to activation of hydroxycarboxylic acid receptor 2 on epidermal Langerhans cells as well on keratinocytes, and subsequent formation of prostaglandins D2 and E2. Different pharmaceutical formulations have been developed: an extended-release form (Niaspan®), which causes fewer flushes because of its lower absorption rate; an extended-release form combined with laropiprant, a prostaglandin D₂ antagonist (Cordaptive™, also called Tredaptive™); and niacin combined with simvastatin (Simcor®) or lovastatin (Advicor®). Two large publicized clinical trials have been recently designed to evaluate whether adding these modern niacin formulations to statin therapy provides incremental benefit over statin therapy alone in terms of cardiovascular primary events in patients with established CVD: AIM-HIGH (Atherosclerosis Intervention in Metabolic Syndrome with Low HDL/High Triglycerides and Impact on Global Health Outcomes) and HPS2-THRIVE (Heart Protection Study 2-Treatment of High density lipoprotein to Reduce the Incidence of Vascular Events).

AIM-HIGH, which compared the Niaspan®/simvastatin combination with simvastatin alone in about 3500 patients was stopped before the planned end because of a lack of cardiovascular reducing effects and because of a non-significant trend towards an increase in ischaemic strokes in the treated group. However, as explained by Nicholls [19], several limitations may balance the negative findings of this study, including higher doses of simvastatin and greater use of ezetimibe (22% vs. 10%) in the statin only arm compared with in the statin/niacin arm, as well as the fact that the statin only group actually received a low dose of niacin (up to 200 mg) to mimic flushes and did have an increase in HDL-C (+9.8%). Finally, the study was stopped after only 36 months, which might have been too early to observe benefits in patients with baseline LDL-C concentrations of only 71 mg/dL.

Concerning HPS2-THRIVE, which evaluated the Cordaptive™/statin combination versus statin alone in more than 25,600 patients, the trial was recently stopped after only 3.9 years because of serious adverse events – not

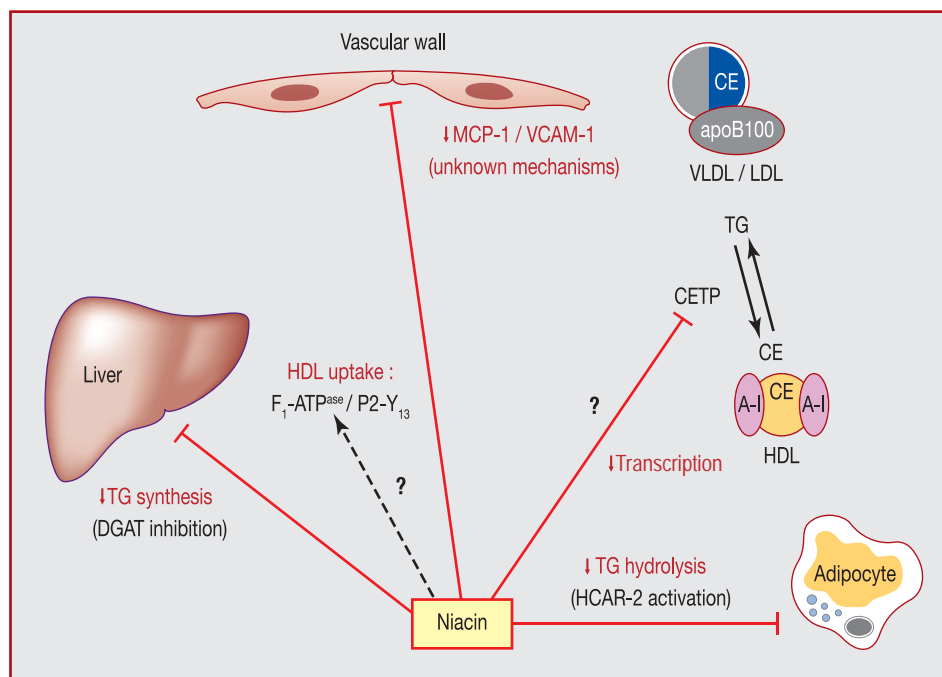


Figure 2. Possible explanations for the effects of nicotinic acid on lipoprotein profile and protective mechanisms. apo: apolipoprotein; ATP: adenosine triphosphate; CE: cholesterol ester; CETP: cholesteryl ester transfer protein; DGAT: diacylglycerol acyltransferase; HCAR: hydroxycarboxylic acid receptor; HDL: high-density lipoprotein; LDL: low-density lipoprotein; MCP: monocyte chemoattractant protein; P2Y₁₃: purinergic receptor 13; TG: triglycerides; VCAM: vascular cellular adhesion molecule; VLDL: very-low-density lipoprotein.

detailed yet – in the treated arm. The primary endpoints (i.e., reduction in heart attacks and strokes) were also not met and a statistical increase in non-fatal side effects was even reported in the niacin-treated group [20]. However, a detailed subgroup analysis, especially of those subgroups most likely to benefit from niacin therapy (i.e., patients with low HDL-C concentration), might yield more insight into this trial. Moreover, despite these disappointing extended-release niacin trials (AIM-HIGH and HPS-THRIVE), a recent meta-analysis of 11 clinical trials, including AIM-HIGH, in 9959 subjects, showed that niacin therapy was associated with a significant reduction in major CVD and coronary heart disease events [21], which might partly rescue niacin's reputation as an effective preventive therapy.

In conclusion, better understanding of niacin's actions and targets might help to better design combination therapy and new treatment strategies for atherosclerosis.

Cholesteryl ester transfer protein inhibitors

Given the proatherogenic potential of CETP, which favours transfer of cholesterol from HDL to LDL, synthetic inhibitors were developed to restore a favourable lipoprotein profile by increasing HDL-C concentration and lowering LDL-C concentration. Torcetrapib (Pfizer, New York, USA) was the first molecule to be designed as an inhibitor of CETP lipid transfer functions. Evaluated in phase III (the ILLUMINATE study), its development was stopped due to a global overall mortality in patients treated with torcetrapib, although HDL-C concentration had increased. Subsequent analyses showed that this negative effect was due to activation of the renin-angiotensin-aldosterone system, increasing blood

pressure, but also to direct vascular endothelium toxicity [33].

After this failure, new drugs were still developed: dalcetrapib (Hoffman-La Roche Inc, Basel, Switzerland), evacetrapib (Eli Lilly and Co, Indianapolis, USA) and anacetrapib (Merck & Co, Whitehouse station, USA). Concerning dalcetrapib, several studies have been scheduled (dal-VESSEL and dal-PLAQUE), but the phase III dal-OUTCOME study was stopped in May 2012 due to a lack of significant results. The safety of evacetrapib has been demonstrated in a phase II study involving 398 patients [25]; a phase III study began in October 2012 to evaluate its efficacy and safety (versus placebo) in participants with high-risk vascular disease (the ACCELERATE study). Lastly, two phase III trials are currently underway for anacetrapib: the DEFINE trial (Determining the Efficacy and Tolerability of CETP Inhibition with Anacetrapib) was completed by the end 2012 and the REVEAL HSP-3 TIMI-55 trial (Randomized Evaluation of the Effects of Anacetrapib through Lipid Modification), which includes 30,000 coronary patients treated with statins, will end in 2017.

Reconstituted high-density lipoprotein

Intravenous administration of liposomal complexes containing human proapolipoprotein A-I (the secreted form of apoA-I) in four patients with familial hypercholesterolaemia showed a > 30% stimulation of faecal excretion of cholesterol and biliary acids [34]. This increase in RCT was further confirmed in the first clinical trial using purified human apoA-I and synthetic phospholipids [35]. Purified apoA-I was then combined with soya phosphatidylcholines and the product was called CSL-111. These reconstituted HDLs were tested

in the ERASE trial (Effect of rHDL on Atherosclerosis Safety and Efficacy) in patients with acute coronary syndrome [36]. Although CSL-111 produced a 3.4% volume reduction in the atherosclerotic plaque after a weekly perfusion over 1 month, its development has been stopped because of liver toxicity. Second generation products have emerged, such as CSL-112 (CSL Laboratories, Victoria, Australia) and CER-001 (Cerenis Therapeutics Labège, France), which are currently being tested in acute coronary syndrome patients (a phase II study) and in patients with familial hypercholesterolaemia (for CER-001).

In the early 1980s, apoA-I Milano was discovered in Northern Italy (Limone sul Garda) in three members of a family presenting with significant hypertriglyceridaemia associated with low HDL-C concentrations (0.07–0.14 g/L), without any manifestation of atherosclerosis [37]. This abnormal apoA-I differs from the native form by a substitution at position 173, where arginine is replaced by cysteine, leading to loss of stability and decreased affinity for lipids, explaining the accelerated degradation of free apoA-I by the kidneys. However, it has since been demonstrated that this mutation allows formation of apoA-I Milano homodimers and that this particular apoA-I displays a higher capacity for cellular cholesterol efflux and has a potent antioxidant activity, therefore preventing phospholipid oxidation [38,39]. Reconstituted HDL containing apoA-I Milano dimers and synthetic phospholipids (named ETC-216 and then MDCO-216; The Medicines Company, Parsippany, USA) have shown beneficial effects in patients with acute coronary syndrome: weekly perfusions over 5 weeks led to a 4.2% decrease in volume of the atherosclerotic plaque [26].

Despite encouraging results, reconstituted HDL therapies have not yet emerged. However, rapid regression of a condition that has developed over years was observed after only a few injections, which indicates the potential value of this therapeutic approach.

Mimetic peptides

ApoA-I is a major atheroprotective protein due to its antioxidant properties and its capacity to capture excess cell cholesterol, notably from macrophages. However, this molecule is difficult and expensive to produce, which has motivated the synthesis of smaller oral ingestible apoA-I mimetic peptides. Among them, synthesis of octadecapeptides called 18A has emerged; although they do not present any homology with apoA-I, they are able to mimic its functional activity and have identical binding capacity. In this family, peptides 4F and 5F appear to be the most effective. The 4F peptide binds oxidized phospholipids with higher affinity than apoA-I [40] and oral administration of D-4F leads to a decrease in the HDL inflammatory index [41]. The levorotatory enantiomer called L-4F (or APL180; Novartis, Basel, Switzerland), which is degraded in the intestine and thus cannot be orally administered, has been tested via intravenous infusion for 7 days or via subcutaneous injection for 28 days. Unfortunately, despite modification of the lipoprotein profile, the HDL inflammatory index did not improve and authors observed a trend toward elevated C-reactive protein [27].

Delipidated high-density lipoprotein

Thanks to a selective delipidation method allowing conversion of large lipidated HDL to lipid-poor HDL, RCT was found to be enhanced [42]. A clinical study, the LS-001 (Lipid Sciences Selective Delipidation Trial), has evaluated the effect of serial autologous infusions of delipidated HDL in 14 patients with acute coronary syndrome. Although the results showed its harmlessness, no significant improvement was seen in atheroma volume despite a non-significant decrease [43].

Peroxisome proliferator-activated receptor agonists (α and γ glitazars)

Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) are nuclear transcription receptors involved in lipid and carbohydrate homeostasis; they are composed of three isoforms (α , γ and β/δ). After activation, PPARs heterodimerize with the retinoid X receptor and further bind to a specific DNA region called peroxisome proliferator response element, localized on target genes.

The first agonists synthesized, commonly known as fibrates, targeted the α isoform, which is mainly expressed in liver, heart and muscle. After binding, expression of numerous genes is up-regulated, including genes encoding apoA-I, apoA-II, ABCA1 and acyl-CoA synthetase, the last of which promotes fatty acid oxidation. Other genes, such as fibrinogen, cyclo-oxygenase 2, vascular cell adhesion molecule and C-reactive protein, are down-regulated, thus enabling an overall protective effect. Indeed, fibrates improve lipoprotein plasma profile and insulin sensitivity, depress inflammation and clotting and enhance vasomotor reactivity [28]. As summarized by Chapman, triglycerides are reduced by 30–50%, LDL by 15–20% and HDL-C rises from 5% to 15% [44]. Many clinical studies have assessed the impact of fibrates on clinical outcomes in primary and secondary prevention (the Helsinki Heart Study, the VA-HIT study, the BIP study, the FIELD study, etc.). Despite a 34% reduction in major coronary events at 5 years, as shown by the Helsinki Heart Study [44], fibrates have failed to reduce overall mortality in the general population. They are potentially useful in specific populations and selective subgroups: for instance, fenofibrate and bezafibrate could be useful for diabetes or metabolic syndrome and gemfibrozil could be useful for patients with dyslipidaemia [45].

The γ isoform, highly expressed in adipose tissue and muscle, regulates glucose homeostasis and insulin sensitivity, in addition to its role in lipid metabolism and inflammation. Thus, agonists called glitazones have been designed to be used in type 2 diabetes mellitus. Unfortunately, due to side effects (bladder cancer for pioglitazone, increased cardiovascular risk for rosiglitazone and peripheral oedema for both), this family of molecules is no longer marketed in France.

Thus, the general idea was to create dual agonists that are able to impact lipid and carbohydrate metabolism by targeting the two isoforms, α and γ . New drugs were therefore designed, called glitazars, which have positive effects on lipid metabolism due to activation of PPAR- α in the liver and insulin-sensitizing effects, as a

consequence of PPAR- γ activation, making possible their use in metabolic syndrome [46], a condition associated with low HDL. Due to side effects (haematological disturbance, serum creatinine increase, etc.) [45], most molecules were given up on, except for aleglitazar (Hoffmann-La Roche Inc., Basel, Switzerland). During a 16-week administration period, its safety and positive impact on lipoprotein profile was shown in type II diabetics in the phase II SYNCHRONY study [47]. The maximum effect on HDL-C concentration was seen with a 150 μ g dose (placebo-adjusted increase of 20.7%, 13.2–28.2) and was responsible for a greater effect than 45 mg of pioglitazone. The same dose led to a decrease in triglycerides (–43.4%, –27.4 to –59.4) and LDL-C (–15.5%, –5.4 to –25.6). Glycated haemoglobin decreased in a dose-dependant manner. Furthermore, according to an investigator update from Roche's website, AleNephro (a phase IIb study) has also demonstrated the renal safety of this molecule in type II diabetes patients with stage 3 chronic kidney disease. A phase III study (AleCardio), including patients with type 2 diabetes hospitalized for acute coronary syndrome, began in 2009 and results are expected in 2015.

Other targets

Liver X receptor agonists

Liver X receptors (LXRs) belong to a nuclear receptor family involved in lipid homeostasis. Activated by oxysterols, derived from cholesterol degradation or from dietary intake, LXRs consist of two isoforms (α and β). While LXR α is highly expressed in liver, intestine, kidney, spleen and adipose tissue, LXR β is ubiquitously expressed, but at lower concentrations. Considered as intracellular sensors, they can activate transcription of many genes involved in RCT, such as *ABCA1*, *ABCG1* and *CETP*, and, at the same time, they depress expression of genes involved in intestinal cholesterol absorption, such as Niemann-Pick C1-Like 1 (*NPC1L1*). However, as LXR α also stimulates the synthesis of fatty acids and triglycerides in the liver, its agonists have lipogenic effects. This emphasizes the need to synthesize LXR β -specific agonists, which is currently difficult to achieve due to a high sequence homology between the two isoforms (80% homology sequence). Besides, a positive effect on *CETP* transcription was also noted, which could confer fewer beneficial effects in humans than those observed in species lacking *CETP*, such as mice.

Stimulation of apolipoprotein A-I transcription

RVX-208 (Resverlogix Corp., Calgary, Canada) was the first bromo and extra terminal (BET) bromodomain (an epigenetic regulator) inhibitor to be used in therapeutics. This oral inducer of apoA-I synthesis was first evaluated over 12 weeks in 225 patients from the ASSURE study (ApoA-I Synthesis Stimulation Evaluation in Patients Requiring Treatment for Coronary Artery Disease) [48]. ApoA-I changes did not reach statistical significance, although a trend was observed, but higher increases could require chronic treatment. HDL-C concentrations increased from 3.2% to 8.3% according to dose and transient elevations of liver transaminases were seen. Two phase II studies are under way: SUSTAIN (The Study of Quantitative Serial Trends in

Lipids with ApoA-I Stimulation), which is evaluating its safety and efficacy on blood lipids; and ASSURE (The ApoA-I Synthesis Stimulation and Intravascular Ultrasound for Coronary Atheroma Regression Evaluation), which is studying its impact on atherosclerotic plaques. A press release on the Resverlogix website (August 28, 2012) states that after 24 weeks of treatment in the SUSTAIN study, there was a statistical increase in HDL-C, apoA-I and large HDL particle concentrations without any further increase in transaminase concentrations. Results of the ASSURE study are expected in 2013.

Modulation of reverse cholesterol transport

With the aim of increasing HDL-C concentration, researchers tried to find new drugs targeting HDL uptake and catabolism by the liver. In this regard, Masson et al. tested a novel SR-BI inhibitor – ITX5061 – in mice and humans [29]. The use of ITX5061 in hypertriglyceridaemic patients led to an increase in HDL-C concentration of about 20% without modifying LDL-C or triglyceride concentrations. Furthermore, ITX5061 was responsible for a reduction in early atherosclerotic lesions in the aortic arch in mice fed an atherogenic diet. However, the beneficial effect of inhibition of SR-BI, which participates in hepatic HDL-C uptake and cellular cholesterol efflux, is questionable, as this would rather impair RCT.

Conclusion

The concept of HDL-therapy, considered as one of the most promising strategies for the treatment of atherosclerosis, is not yet established (as summarized in Table 1). Epidemiological studies had given hope that a simple increase in HDL-C would reduce cardiovascular risk. However, HDL metabolism is quite complex and is still not completely understood. The termination of the *CETP* inhibitor dalcetrapib, the lack of effect of niacin in the AIM-HIGH and HPS2-THRIVE clinical trials [19,20] and evidence for a lack of association with cardiovascular risk in genome-wide association studies of HDL genes [30] have all raised questions about the HDL hypothesis and have cast many doubts about the relevance of increasing HDL-C concentration per se.

One argument to explain the HDL controversy is that HDL-C concentration is a poor measure for targeted intervention. HDL-C concentration is considered a surrogate for the efficiency of cholesterol efflux from tissues. However, given that macrophage-derived cholesterol represents only a minor proportion of the cholesterol transported by HDL particles, this may be an inadequate measure. Moreover, HDL-C concentration is a static measurement, and does not take into account the dynamics of the HDL particle population and HDL functionality, which might differ depending on the metabolic status of individuals. For instance, patients with type 2 diabetes display a higher catabolic rate of HDL-ApoA-I [49] and HDL from coronary patients does not have endothelial anti-inflammatory effects [50], illustrating the need to identify more precisely the patient subgroups that should benefit from personalized HDL therapies.

In this context, although there is still an urgent need to better understand the molecular mechanisms underlying multiple regulation downstream HDL action, other therapeutic strategies aiming to improve some critical steps

Table 1 Summary of high-density lipoprotein therapeutic options, targets and main effects.

Drugs	Targets	Positive impacts	Negative impacts
Niacin (nicotinic acid)	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Inhibition of DGAT-2 (final enzyme of TG synthesis in the liver) [17,18] ✓ Activation of HCAR-2 (fewer free fatty acids delivered by the adipocyte) [18] ✓↓ Expression of the β chain of F₁-ATPase on the hepatocyte cell surface [17] ✓↓ CETP transcription in animals [22] ✓↓ VCAM-1 and MCP-1 expression (mechanism?) [18] ✓↓ Fibrinogen and PAI-1 expression (mechanism?) [23] ✓ Activation of HCAR-2 (Langerhans cells and macrophages): prostaglandin D2 and E2 synthesis (activation of their respective receptors in dermal capillaries) [18] 	<ul style="list-style-type: none"> ✓↓ Plasmatic TG concentration ✓↑ Plasma HDL-C and apoA-I concentrations ✓ Anti-inflammatory ✓ Antithrombotic 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Lack of cardiovascular reducing effect in secondary prevention trials (AIM-HIGH and HPS2-THRIVE) [19,20] but a recent meta-analysis involving 11 clinical trials showed a significant reduction in major cardiovascular diseases and coronary heart disease events [21] ✓ Skin flushes (dose related, poor compliance)
Inhibitors of CETP	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Inhibition of CETP (anacetrapib, dalcetrapib, evacetrapib, torcetrapib) 	<ul style="list-style-type: none"> ✓↑ Plasma HDL-C concentration (anacetrapib and evacetrapib > 130%, torcetrapib \approx 70%, dalcetrapib \approx 30%) [24] ✓↓ Plasma LDL-C concentration [24] ✓ Safety for evacetrapib [25] ✓ Phase III anacetrapib clinical trials ongoing ✓ Modification of lipoprotein profile 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ For torcetrapib: increased blood pressure and aldosterone production ✓ For torcetrapib: increased blood pressure and aldosterone production ✓ For dalcetrapib: no significant reduction in cardiovascular adverse events
Reconstituted HDL (liposomes with purified apoA-I or apoA-I Milano)	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Mimic HDL properties 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Decrease in volume of atherosclerotic plaque (apoA-I Milano) [26] ✓ Second generation products currently being tested in ACS and familial hypercholesterolaemia 	

Table 1 (Continued)

Drugs	Targets	Positive impacts	Negative impacts
Mimetic peptides (octapeptides)	✓ Mimic apoA-I properties	✓ Modification of lipoprotein profile [27]	✓ No modification of HDL inflammatory index [27]
PPAR α and γ agonists (glitazars)	✓ PPAR α activation: \uparrow transcription of apoA-I and apoA-II, \downarrow transcription of VCAM-1 and fibrinogen [28] ✓ PPAR γ activation of genes involved in glucose homeostasis	✓ Improvement in lipoprotein profile ✓ Insulin-sensitizing effects ✓ Current phase III aleglitazar clinical trial in type 2 diabetes	✓ Toxicity of first generation drugs
PPAR α and γ agonists (glitazars)	✓ PPAR α activation: \uparrow transcription of apoA-I and apoA-II, \downarrow transcription of VCAM-1 and fibrinogen [28] ✓ PPAR γ activation of genes involved in glucose homeostasis	✓ Improvement in lipoprotein profile ✓ Insulin-sensitizing effects ✓ Current phase III aleglitazar clinical trial in type 2 diabetes	✓ Toxicity of first generation drugs
LXR agonists	✓ LXR α and β : \uparrow expression of genes involved in RCT and \downarrow expression of genes involved in intestinal cholesterol absorption		✓ Lipogenic effects
BET bromodomain inhibitors	✓ Epigenetic regulation: stimulation of apoA-I transcription	✓ \uparrow apoA-I and HDL concentrations [29] ✓ Two phase II studies underway	
Modulators of reverse cholesterol transport	✓ Inhibition of SR-BI (BLT-1, ITX-5061, ML278, ML279) ✓ Activation of P2Y ₁₃ (AR-C69931MX, ct1007900)	✓ \uparrow HDL-C, no modification of LDL [30] ✓ \uparrow Hepatic HDL-C uptake [31] ✓ \uparrow RCT [31] ✓ Atherosclerosis regression in animal models [32]	✓ \downarrow Hepatic HDL-C uptake could lead to detrimental accumulation with impairment of their functions ✓ \downarrow HDL-C (?) could lead to \downarrow in pleiotropic activities of HDL

apo: apolipoprotein; ACS: acute coronary syndrome; ATP: adenosine triphosphate; BET: bromo and extra terminal; CETP: cholesteryl ester transfer protein; DGAT: diacylglycerol acyltransferase; HCAR: hydroxycarboxylic acid receptor; HDL: high-density lipoprotein; HDL-C: high-density lipoprotein cholesterol; LDL: low-density lipoprotein; LDL-C: low-density lipoprotein cholesterol; LXR: liver X receptor; MCP: monocyte chemoattractant protein; P2Y₁₃: purinergic receptor 13; PAI: plasminogen activator inhibitor; PPAR: peroxisome proliferator-activated receptor; RCT: reverse cholesterol transport; SR-BI: scavenger receptor class B type I; TG: triglycerides; VCAM: vascular cell adhesion molecule; VLDL: very-low-density lipoprotein.

of HDL metabolism and HDL pleiotropic beneficial functions (i.e., antioxidant, anti-inflammatory) have emerged. For instance, among recent findings, the newly discovered HDL endocytosis pathway, involving ecto-F₁-ATPase and the P2Y₁₃ receptor, could be an interesting target for increasing HDL liver uptake [5,6,31]. Indeed, ct1007900, a P2Y₁₃ receptor agonist, has recently been tested in animal models, demonstrating potential beneficial effects on atherosclerotic plaques [32].

In conclusion, the residual risk persisting under statin treatment means that more research is needed on potential therapeutic approaches and that, despite numerous setbacks, HDL should be targeted by new drugs addressing specific mechanisms.

Disclosure of interest

Jean Ferrières has received grants from and undertaken educational activities for AstraZeneca, MSD Chibret, Novartis and Servier. Meyer Elbaz is involved in the REVEAL study (MSD) and the ACCELERATE study (Lilly). The other authors (Céline Verdier, Laurent O. Martinez, Annelise Genoux, Bertrand Perret) declare that they have no conflicts of interest concerning this article.

References

- [1] World Health Organization. Cardiovascular diseases. Fact sheet No 317. Updated March 2013. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/index.html>
- [2] Baigent C, Keech A, Kearney PM, et al. Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins. *Lancet* 2005;366:1267–78.
- [3] Hausenloy DJ, Yellon DM. Targeting residual cardiovascular risk: raising high-density lipoprotein cholesterol levels. *Heart* 2008;94:706–14.
- [4] Bruckert E. Epidemiology of low HDL-cholesterol: results of studies and surveys. *European Heart Journal Supplements* 2006;8(Suppl. F):F17–22, <http://dx.doi.org/10.1093/eurheartj/sul036>.
- [5] Martinez LO, Jacquet S, Esteve JP, et al. Ectopic beta-chain of ATP synthase is an apolipoprotein A-I receptor in hepatic HDL endocytosis. *Nature* 2003;421:75–9.
- [6] Fabre AC, Malaval C, Ben Addi A, et al. P2Y₁₃ receptor is critical for reverse cholesterol transport. *Hepatology* 2010;52:1477–83.
- [7] Besler C, Luscher TF, Landmesser U. Molecular mechanisms of vascular effects of high-density lipoprotein: alterations in cardiovascular disease. *EMBO Mol Med* 2012;4:251–68.
- [8] Nofer JR, Kehrel B, Fobker M, et al. HDL and arteriosclerosis: beyond reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis* 2002;161:1–16.
- [9] Radojkovic C, Genoux A, Pons V, et al. Stimulation of cell surface F₁-ATPase activity by apolipoprotein A-I inhibits endothelial cell apoptosis and promotes proliferation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;29:1125–30.
- [10] Camont L, Chapman MJ, Kontush A. Biological activities of HDL subpopulations and their relevance to cardiovascular disease. *Trends Mol Med* 2011;17:594–603.
- [11] Norata GD, Pirillo A, Ammirati E, et al. Emerging role of high density lipoproteins as a player in the immune system. *Atherosclerosis* 2012;220:11–21.
- [12] G. HB, Rao VS, Kakkar VV. Friend turns foe: transformation of anti-inflammatory HDL to proinflammatory HDL during acute-phase response. *Cholesterol* 2011;2011:274629.
- [13] Mohler 3rd ER, Ballantyne CM, Davidson MH, et al. The effect of darapladib on plasma lipoprotein-associated phospholipase A2 activity and cardiovascular biomarkers in patients with stable coronary heart disease or coronary heart disease risk equivalent: the results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Am Coll Cardiol* 2008;51:1632–41.
- [14] Ansell BJ, Fonarow GC, Fogelman AM. The paradox of dysfunctional high-density lipoprotein. *Curr Opin Lipidol* 2007;18:427–34.
- [15] Kelesidis T, Currier JS, Huynh D, et al. A biochemical fluorometric method for assessing the oxidative properties of HDL. *J Lipid Res* 2011;52:2341–51.
- [16] Ansell BJ, Navab M, Hama S, et al. Inflammatory/antiinflammatory properties of high-density lipoprotein distinguish patients from control subjects better than high-density lipoprotein cholesterol levels and are favorably affected by simvastatin treatment. *Circulation* 2003;108:2751–6.
- [17] Kamanna VS, Ganji SH, Kashyap ML. Recent advances in niacin and lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol* 2013;24:239–45.
- [18] Lukasova M, Hanson J, Tunaru S, et al. Nicotinic acid (niacin): new lipid-independent mechanisms of action and therapeutic potentials. *Trends Pharmacol Sci* 2011;32:700–7.
- [19] Nicholls SJ. Is niacin ineffective? Or did AIM-HIGH miss its target? *Cleve Clin J Med* 2012;79:38–43.
- [20] Merck. Merck Announces HPS2-THRIVE Study of TREDAPTIVE™ (Extended-Release Niacin/Laropiprant) Did Not Achieve Primary Endpoint. 2012. Available at: <http://www.mercknewsroom.com/press-release/prescription-medicine-news/merck-announces-hps2-thrive-study-tredaptive-extended-relea>
- [21] Lavigne PM, Karas RH. The current state of niacin in cardiovascular disease prevention: a systematic review and meta-regression. *J Am Coll Cardiol* 2013;61:440–6.
- [22] van der Hoorn JW, de Haan W, Berbee JF, et al. Niacin increases HDL by reducing hepatic expression and plasma levels of cholesteryl ester transfer protein in APOE*3Leiden.CETP mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:2016–22.
- [23] Carlson LA. Nicotinic acid: the broad-spectrum lipid drug. A 50th anniversary review. *J Intern Med* 2005;258:94–114.
- [24] Shinkai H. Cholesteryl ester transfer-protein modulator and inhibitors and their potential for the treatment of cardiovascular diseases. *Vasc Health Risk Manag* 2012;8:323–31.
- [25] Nicholls SJ, Brewer HB, Kastelein JJ, et al. Effects of the CETP inhibitor evacetrapib administered as monotherapy or in combination with statins on HDL and LDL cholesterol: a randomized controlled trial. *JAMA* 2011;306:2099–109.
- [26] Nissen SE, Tsunoda T, Tuzcu EM, et al. Effect of recombinant ApoA-I Milano on coronary atherosclerosis in patients with acute coronary syndromes: a randomized controlled trial. *JAMA* 2003;290:2292–300.
- [27] Watson CE, Weissbach N, Kjems L, et al. Treatment of patients with cardiovascular disease with L-4F, an apo-A1 mimetic, did not improve select biomarkers of HDL function. *J Lipid Res* 2011;52:361–73.
- [28] Han SH, Quon MJ, Koh KK. Beneficial vascular and metabolic effects of peroxisome proliferator-activated receptor- α activators. *Hypertension* 2005;46:1086–92.
- [29] Masson D, Koseki M, Ishibashi M, et al. Increased HDL cholesterol and apoA-I in humans and mice treated with a novel SR-BI inhibitor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;29:2054–60.
- [30] Voight BF, Peloso GM, Orho-Melander M, et al. Plasma HDL cholesterol and risk of myocardial infarction: a mendelian randomisation study. *Lancet* 2012;380:572–80.

- [31] Serhan N, Cabou C, Verdier C, et al. Chronic pharmacological activation of P2Y₁₃ receptor in mice decreases HDL-cholesterol level by increasing hepatic HDL uptake and bile acid secretion. *Biochim Biophys Acta* 2013;1831:719–25.
- [32] Barbaras R, Baron R, Goffinet M, et al. Antiatherosclerotic activity of a new P2Y₁₃ receptor agonist (ct1007900) in animal models. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 2012;32:A493.
- [33] Arsenault BJ, Boekholdt SM, Tardif JC, et al. De-risking the clinical development of cholesteryl ester transfer protein inhibitors: how much is good enough? *Eur Heart J* 2012;33:1548–50.
- [34] Eriksson M, Carlson LA, Miettinen TA, et al. Stimulation of fecal steroid excretion after infusion of recombinant proapolipoprotein A-I. Potential reverse cholesterol transport in humans. *Circulation* 1999;100:594–8.
- [35] Nanjee MN, Cooke CJ, Garvin R, et al. Intravenous apoA-I/lecithin discs increase pre-beta-HDL concentration in tissue fluid and stimulate reverse cholesterol transport in humans. *J Lipid Res* 2001;42:1586–93.
- [36] Tardif JC, Gregoire J, L'Allier PL, et al. Effects of reconstituted high-density lipoprotein infusions on coronary atherosclerosis: a randomized controlled trial. *JAMA* 2007;297:1675–82.
- [37] Franceschini G, Sirtori CR, Capurso 2nd A, et al. A-IMilano apoprotein. Decreased high density lipoprotein cholesterol levels with significant lipoprotein modifications and without clinical atherosclerosis in an Italian family. *J Clin Invest* 1980;66:892–900.
- [38] Bielicki JK, Oda MN. Apolipoprotein A-I(Milano) and apolipoprotein A-I(Paris) exhibit an antioxidant activity distinct from that of wild-type apolipoprotein A-I. *Biochemistry* 2002;41:2089–96.
- [39] Franceschini G, Calabresi L, Chiesa G, et al. Increased cholesterol efflux potential of sera from ApoA-IMilano carriers and transgenic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:1257–62.
- [40] Van Lenten BJ, Wagner AC, Jung CL, et al. Anti-inflammatory apoA-I-mimetic peptides bind oxidized lipids with much higher affinity than human apoA-I. *J Lipid Res* 2008;49:2302–11.
- [41] Bloedon LT, Dunbar R, Duffy D, et al. Safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of oral apoA-I mimetic peptide D-4F in high-risk cardiovascular patients. *J Lipid Res* 2008;49:1344–52.
- [42] Sacks FM, Rudel LL, Conner A, et al. Selective delipidation of plasma HDL enhances reverse cholesterol transport in vivo. *J Lipid Res* 2009;50:894–907.
- [43] Waksman R, Torguson R, Kent KM, et al. A first-in-man, randomized, placebo-controlled study to evaluate the safety and feasibility of autologous delipidated high-density lipoprotein plasma infusions in patients with acute coronary syndrome. *J Am Coll Cardiol* 2010;55:2727–35.
- [44] Chapman J. Fibrates: therapeutic review. *J Diabetes Vasc Dis* 2006;6:11–20.
- [45] Friedland SN, Leong A, Filion KB, et al. The cardiovascular effects of peroxisome proliferator-activated receptor agonists. *Am J Med* 2012;125:126–33.
- [46] Natarajan P, Ray KK, Cannon CP. High-density lipoprotein and coronary heart disease: current and future therapies. *J Am Coll Cardiol* 2010;55:1283–99.
- [47] Henry RR, Lincoff AM, Mudaliar S, et al. Effect of the dual peroxisome proliferator-activated receptor- α /gamma agonist aleglitazar on risk of cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes (SYNCHRONY): a phase II, randomised, dose-ranging study. *Lancet* 2009;374:126–35.
- [48] Nicholls SJ, Gordon A, Johansson J, et al. Efficacy and safety of a novel oral inducer of apolipoprotein a-I synthesis in statin-treated patients with stable coronary artery disease: a randomized controlled trial. *J Am Coll Cardiol* 2011;57:1111–9.
- [49] Verges B, Florentin E, Baillot-Rudoni S, et al. Rosuvastatin 20 mg restores normal HDL-apoA-I kinetics in type 2 diabetes. *J Lipid Res* 2009;50:1209–15.
- [50] Besler C, Heinrich K, Rohrer L, et al. Mechanisms underlying adverse effects of HDL on eNOS-activating pathways in patients with coronary artery disease. *J Clin Invest* 2011;121:2693–708.

CHAPITRE III :

L'APPORT DE LA GÉNÉTIQUE

Dans le cadre d'une meilleure compréhension des pathologies cardio-vasculaires, les recherches se sont orientées sur l'influence de la génétique sur le développement de la plaque d'athérome et sur la survenue d'anomalies du bilan lipidique. Les premières techniques de biologie moléculaire ont ainsi permis d'établir un lien entre certains polymorphismes présents dans des gènes intervenant dans le métabolisme du cholestérol et leur impact sur les paramètres lipidiques. Suite à ces premières avancées, le développement de techniques de plus en plus performantes avec les séquenceurs de nouvelle génération a permis aux chercheurs de travailler simultanément sur un nombre croissant non seulement d'individus mais également de SNP (Single Nucleotide Polymorphism). L'avènement des études d'association pangénomique ou GWAS (Genome-Wide Associations Studies) était enfin arrivé. Dans ce chapitre, nous ferons un état des lieux des connaissances sur les modifications géniques impactant le métabolisme du HDL-cholestérol ainsi que sur l'apport des études d'association pangénomique dans la compréhension des pathologies cardio-vasculaires.

A) Généralités :

Le génome humain constitue une entité obscure pour les chercheurs puisque bien qu'entièrement séquencé au début de la décennie précédente, de nombreuses zones d'ombres subsistent sur la fonction de nombreux gènes et sur leurs mécanismes de régulation. En effet, seulement 1% du génome est transcrit en ARNm puis traduit en protéines et seul 0.5% de génome supplémentaire constitue le support des ARN non codant et des régions régulatrices de l'expression génique (a J. Marian & Belmont, 2011). En outre, avec plus de trois milliards de paires de bases, nous savons maintenant que tout homme partage 99.5% de son génome avec chaque membre de son espèce. Par conséquent, seul 0.5% de la séquence permet d'expliquer les différences interindividuelles et notamment la susceptibilité aux maladies (Roberts, Wells, Stewart, Dandona, & Chen, 2010). A titre d'exemple et à ce jour, plus de 53 millions de variations portant sur un seul nucléotide ont été identifiées au sein des 25000 gènes que comporte le génome humain (National Center for Biotechnology Information (NCBI), National Library of Medicine. Database of Single Nucleotide Polymorphisms, accès du 09 août 2012).

a. Les principales mutations génétiques rencontrées :

Depuis la découverte dans les années 1980 de la substitution possible d'un seul nucléotide par analyse du polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP), les nouvelles technologies ont permis de mettre en évidence de nombreuses formes de variations génétiques dans le génome humain. Ces mutations se présentent sous des formes différentes et peuvent toucher d'un seul nucléotide à des séquences de plusieurs milliers de bases comme illustré par la figure 22 ci-dessous.

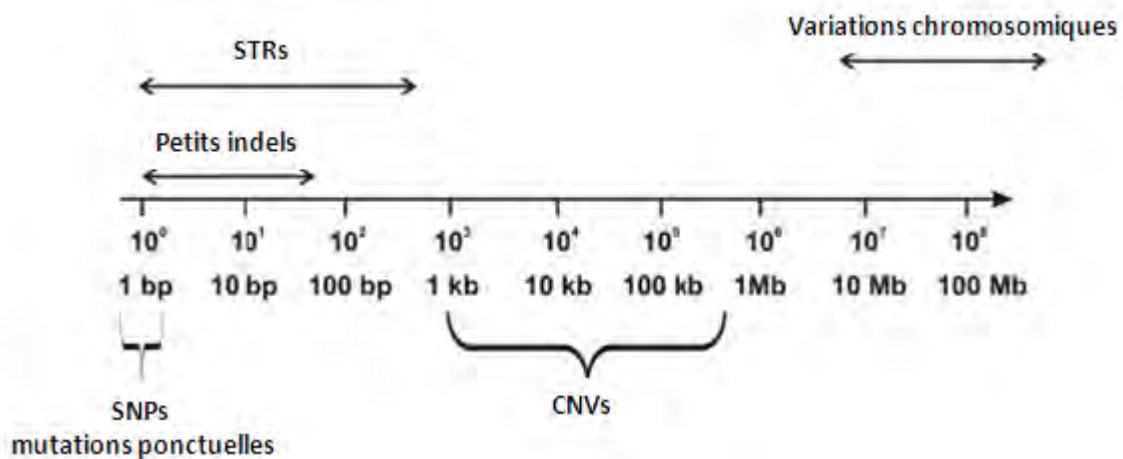


Figure 22 : différentes mutations rencontrées dans le génome. Adapté de (Pollex & Hegele, 2007). Indel : insertion-délétion, STR : Short Tandem Repeats, SNP : Single Nucleotide Polymorphism, CNV : Copy Number Variant.

Elles peuvent être retrouvées de façon ponctuelle dans la population mais il est important de noter que lorsque leur fréquence dépasse 1% dans la population générale, ces mutations prennent le nom de **polymorphisme**. Nous détaillerons dans le présent paragraphe les principaux types de mutations rencontrées.

- Les répétitions en tandem :

Comme expliqué par Ku CS *et al* (Ku, Loy, Salim, Pawitan, & Chia, 2010), les mutations de ce type peuvent être rangées dans deux groupes : les **minisatellites** ou Variable Number of Tandem Repeats (**VNTR**) et les **microsatellites** ou Short Tandem Repeats (**STR**). Dans chacun de ces groupes, un même motif est répété n fois (de dix à des centaines de fois), la différence se situe dans le nombre de nucléotides qui est répété. Alors que pour les minisatellites le motif est constitué d'au moins neuf nucléotides, les microsatellites sont

constitués de la répétition d'un motif de huit nucléotides tout au plus. Autre différence notable, les mini-satellites sont présents quelques milliers de fois dans notre génome au contraire des microsatellites qui se retrouvent dans plus de 100 000 régions réparties tout au long du génome (soit plus de 3% du matériel génétique). Le nombre de répétitions étant hautement variable suivant les individus, les microsatellites peuvent être utilisés en médecine médico-légale (Nakamura, 2009). Leur utilisation dans les analyses de génétique des populations n'est toutefois pas courante en raison de la difficulté d'adapter ces techniques d'analyse à du criblage haut-débit. Ces répétitions en tandem pourraient avoir un rôle fonctionnel important et certains polymorphismes pourraient être impliqués dans de nombreuses pathologies telles que des pathologies neurologiques (dépression, schizophrénie, maladie d'Alzheimer...), le diabète ou encore le cancer (Hannan, 2010). De façon intéressante, dans la Copenhagen City Heart Study, il a été montré que le nombre de répétitions d'un pentanucléotide au sein du promoteur du gène codant l'apolipoprotéine (a) (apo(a)) pouvait moduler les taux de la lipoprotéine (a) (Lp(a)) mais également le risque de développer un IDM ou une maladie coronarienne. En effet, la répétition de ce motif quatorze ou quinze fois augmente les taux de Lp(a) mais aussi le risque de développer un IDM par trois et une pathologie coronarienne par deux dans la population générale par rapport à un plus grand nombre de répétitions (Kamstrup, Tybjaerg-Hansen, Steffensen, & Nordestgaard, 2008). Leur analyse devrait donc être plus fréquente dans les années à venir et il devrait donc y avoir un regain d'intérêt pour ces marqueurs développés dans les années 1980.

- Variation du nombre de copies (**CNV** pour Copy Number Variant) :

Ce terme désigne un fragment d'ADN de plus de 1000 paires de bases qui est présent en nombre variable de copies par rapport au génome de référence. Il s'agit de modifications submicroscopiques qui prennent différentes formes : délétion, duplication, duplication segmentale, inversion, insertion ou bien encore translocation (voir figure 23).

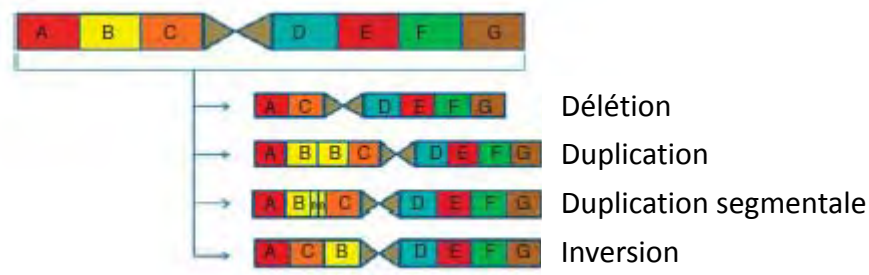


Figure 23 : les différents types de CNVs possibles. Ces variations peuvent inclure un gène entier, un segment particulier de gène ou bien s'étendre sur de larges régions comprenant plusieurs gènes. D'après (Almal & Padh, 2012).

Découverts récemment, on estime que les CNV compteraient pour 12% du génome humain (Redon *et al*, 2006). Présents de façon ubiquitaire, ils sont donc retrouvés fréquemment sans avoir d'incidence phénotypique majeure. Toutefois, comme expliqué par Pollex et Hegele (Pollex & Hegele, 2007), ils peuvent affecter le phénotype des individus en modifiant les niveaux d'expression des gènes et de leur produit en agissant aux niveaux transcriptionnel et traductionnel. Impliqués dans la susceptibilité à de nombreuses maladies telles que des désordres neurologiques (Parkinson, Alzheimer, autisme...) ou métaboliques (obésité, diabète de type 2), ils participent également à la survenue de pathologies cardiovasculaires puisque des CNV ont été retrouvés dans le gène codant le récepteur aux LDL (impliqué dans l'hypercholestérolémie familiale) (Almal & Padh, 2012). Leur influence dans la survenue de ces différentes pathologies est encore mal connue mais les limites posées par l'utilisation des SNP, et notamment la notion d'héritabilité manquante que nous verrons par la suite, devrait faire de ce marqueur un outil d'avenir.

- Insertions ou délétions (InDels) :

Très proches des CNVs, ils n'en diffèrent que par la taille qui est comprise entre 100bp et 1kb. Les insertions-délétions de plus petite taille ne sont pour l'instant pas classifiées mais une future nomenclature pourrait prévoir de les intégrer en tant que groupe supplémentaire. Leur nombre est estimé entre 1,6 et 2,5 millions dans la population humaine (Ku *et al*, 2010). Peu explorés pour l'instant, ils ont été retrouvés dans les régions promotrices et dans les exons de certains gènes, mettant ainsi en avant leur potentiel impact sur la régulation génique.

- Polymorphisme d'un seul nucléotide (ou **SNP** pour Single Nucleotide Polymorphism) :

Ces mutations constituent la variation génétique la plus étudiée mais également la plus fréquente et la plus simple avec la substitution d'un nucléotide par un autre. Comme expliqué plus haut, à la différence des mutations ponctuelles touchant également un seul nucléotide, on leur attribue le nom de polymorphisme en raison de leur fréquence (retrouvés dans plus de 1% de la population générale). Afin d'éviter toute confusion, leur nomenclature est stricte : leur numéro est précédé du préfixe **rs** (pour reference SNP). Elles sont retrouvées dans les régions non codantes (intron, promoteur, régions régulatrices) ou codantes. Dans les régions codantes, on pourra se retrouver face à des mutations **synonymes** (ou **silencieuses**, le codon traduit le même acide aminé de par la dégénérescence du code génétique) ou **non-synonymes**. Sont classées comme non-synonymes, les mutations **faux-sens** (un autre acide aminé est codé) et **non-sens** (apparition d'un codon stop). Alors qu'il apparait évident qu'une mutation non-synonyme peut avoir des conséquences sur la fonction d'une protéine, il faut savoir qu'une mutation synonyme (sSNP) peut également avoir un impact sur la protéine. En effet, elles peuvent altérer la stabilité d'un ARNm ou affecter la structure tertiaire d'une protéine ainsi que son niveau plasmatique (Sauna & Kimchi-Sarfaty, 2011). Plusieurs mécanismes moléculaires sont avancés par les auteurs de cette revue pour expliquer ces phénomènes :

Les protéines de régulation de l'épissage qui reconnaissent de courtes séquences dans les exons et qui sont chargées d'éliminer les introns pourraient, en présence de sSNP, ne plus reconnaître ces sites entraînant ainsi un épissage incorrect avec des sauts d'exon. Les ARNm formés seraient alors tronqués et les protéines traduites pourraient alors être non fonctionnelles.

Les micro-RNAs sont des régulateurs post-transcriptionnels qui impacteraient environ 60% des gènes humains (Friedman, Farh, Burge, & Bartel, 2009). D'environ 22 nucléotides, ces ARN non codants que l'on retrouve dans le cytoplasme des cellules sont connus comme déstabilisant l'ARN et/ou inhibant la production des protéines. Bien que se liant le plus souvent en 3'UTR, ils peuvent agir sur d'autres sites. Dans la maladie de Crohn, il existe une mutation silencieuse exonique qui peut

impacter l'expression d'une protéine qui intervient dans l'élimination des bactéries intra-cellulaires, c'est la protéine IRGM. Cette mutation a pour conséquence de réduire l'interaction entre l'ARNm et le miR196 d'où une perturbation dans la production d'IRGM. La multiplication accrue de bactéries intra-cellulaires qui en résulte intervient alors dans la pathogénie de cette maladie inflammatoire chronique (Brest *et al*, 2011).

Des modifications de la structure secondaire des ARNm suite à une mutation silencieuse peuvent également influencer leur stabilité, en modulant les niveaux de dégradation des ARNm mais aussi la vitesse d'initiation de la traduction (les 50 premiers codons seraient les plus importants à intervenir dans l'efficacité de cette initiation).

L'apparition d'une mutation silencieuse pourrait également avoir des répercussions sur le repliement des protéines pouvant ainsi aboutir à des agrégations et à une moindre synthèse protéique. En effet, une modification de la vitesse de traduction peut s'accompagner d'un repliement différent des différentes parties d'une protéine ce qui pourrait expliquer une structure altérée (Sauna & Kimchi-Sarfaty, 2011).

A côté des sSNP, les mutations non silencieuses (nsSNP) sont actuellement les plus étudiées. En effet, la variation d'un seul acide aminé peut avoir des répercussions sur le repliement ou la stabilité d'une protéine ainsi que sur ses sites d'interaction et donc sur sa fonction. Afin de pouvoir prédire leur impact, il a été imaginé ces dernières années des serveurs d'aide disponibles en ligne basés sur des algorithmes prenant en compte des données différentes. Parmi ces approches *in silico*, **SIFT** (Sorts Intolerant From Tolerant) (Ng & Henikoff, 2001) s'appuie sur l'étude des homologues de séquences alors que **PolyPhen** (Polymorphism Phenotyping) utilise une approche plus empirique en évaluant l'impact de ces mutations directement sur la fonction protéique et sur la structure en trois dimensions de la protéine (Ramensky, Bork, & Sunyaev, 2002). Cette deuxième méthode, basée sur des considérations physiques, a par ailleurs estimé qu'environ 20% de nsSNP endommageraient la protéine (Sunyaev *et al*, 2001).

Devant la quantité énormes de SNP présents dans l'espèce humaine (environ 11 millions sont fréquemment retrouvés (Musunuru & Kathiresan, 2008)), le projet international **HapMap** (lancé en 2002) a permis d'en recenser un certain nombre dans différentes populations. L'étude de l'ADN de 269 sujets d'origine africaine, asiatique ou européenne a ainsi fourni des résultats constituant une base de travail essentielle pour les études d'association pangénomique que nous reverrons plus loin. En particulier, ces travaux ont mené à l'établissement de cartographies mettant en évidence certaines associations préférentielles entre les allèles de différents loci. Ces associations prennent le nom de **déséquilibres de liaison** et sont quantifiées grâce au coefficient de corrélation r^2 (0= pas d'association, 1=corrélation totale) ou de son analogue D' . L'établissement de ces associations autorise donc à ne plus devoir séquencer l'ensemble du génome mais à l'aide d'uniquement certains SNP, que l'on appelle des **tags**, d'étudier un ensemble de polymorphismes. A titre d'exemple, seulement 300 000 à 500 000 SNP suffiraient pour capturer les trois millions de SNP génotypés dans les populations européennes ou asiatiques de HapMap (Musunuru & Kathiresan, 2008). L'utilisation de cette base de données dans des études cliniques repose donc sur l'hypothèse qu'une mutation fréquente dans une population sera fréquemment associée à une pathologie courante elle aussi. Il est toutefois important de noter que les SNP peu, voire très peu, fréquents (moins de 5 et 0.5%) n'ont pas été totalement capturés par cette étude. Il est donc possible qu'un nombre important de variants, impliqués dans le développement de certaines pathologies, ne soit pas identifié si les SNP utilisés comme tags ne sont issus que de la base de données de HapMap. Dans une perspective de mieux connaître le génome humain, l'étude **1000 Genome** a été lancée en 2008 ; elle a pour but de séquencer plus de 1000 génomes dans 11 groupes ethniques différents. Les premiers résultats sont maintenant disponibles, avec 57 génomes entièrement séquencés ainsi qu'une carte des variations génétiques de 1092 génomes humains. Ces résultats permettront donc de considérablement augmenter les connaissances sur les SNP peu fréquents.

b. Introduction aux études d'association pangénomique (GWAS) :

i. **Présentation :**

A l'inverse d'une pathologie monogénique de transmission mendélienne où la transmission est liée à un seul gène hautement pénétrant, de nombreuses pathologies sont liées à des mutations présentes sur plusieurs gènes pour lesquelles l'hérédité n'est pas clairement définie (tableau 15). C'est le cas, comme nous le verrons tout au long de ce chapitre, de la maladie coronarienne, de l'athérosclérose ou encore des variations du profil lipidique sérique.

	Pathologies à transmission mendélienne (rares)	Pathologies multigéniques (fréquentes)
Présentation	Intra-familial Faible nombre d'individus atteints	Ensemble de la population Individus non liés Nombreux individus atteints
Identification du variant en cause	Facile	Difficile
	Mutations récessives	Nombreux variants impliqués
Effet du variant	Important	Faible
Risque absolu	Élevé	Bas
Impact sur la santé publique	Faible	Potentiellement important

Tableau 15 : Comparaison des caractéristiques génétiques des pathologies à transmission mendélienne et des pathologies multigéniques. Adapté de (Schnabel, Baccarelli, Lin, Ellinor, & Benjamin, 2012).

Ces études d'association pangénomique reposent donc sur le principe que c'est l'association de nombreux facteurs génétiques (ayant peu d'impact lorsqu'ils sont pris de façon isolée) qui permet d'expliquer les phénotypes observés. En effet, la notion de base est que les pathologies fréquemment retrouvées dans une population sont liées à des mutations elles aussi fréquentes et que leur effet est additif. C'est pour cela qu'elles utilisent les données recueillies par le projet HapMap afin d'affiner les SNP à étudier et d'en diminuer le nombre. Une GWAS est par conséquent basée sur le génotypage de centaines de milliers de SNP, potentiellement informatifs, disposés tout au long du génome sans toutefois poser des hypothèses biologiques *a priori*. Cependant, en raison du très grand nombre de marqueurs analysés, le risque d'avoir des faux-positifs n'est pas nul et des **études de réplication** sont nécessaires afin de confirmer de potentielles associations dans d'autres populations et/ou

groupes indépendants. Ces faux-positifs sont dus à certains biais tels que des erreurs de génotypage ou de stratification de populations (fréquences alléliques différentes entre des sous-groupes d'une même population) et sont donc à éliminer. Il est pour cela important de vérifier le taux de succès pour chaque génotypage avec un taux minimum de 95% (Pearson & Manolio, 2008). L'analyse statistique est également délicate et fait appel à certaines corrections statistiques telles que la méthode de Bonferroni ou des tests de permutation. De plus, la population étudiée ne doit pas différer de **l'équilibre de Hardy-Weinberg** (qui dit que la fréquence génotypique est constante de génération en génération et peut être calculée à partir des fréquences alléliques) et le seuil de significativité doit être fortement abaissé (une valeur de p à 5.10^{-8} est communément admise) (Attia *et al*, 2009). Entre 2005 et 2008, la variation de près de 100 loci liés à une quarantaine de maladies fréquentes ont été identifiés et répliqués dans ce type d'étude (Pearson & Manolio, 2008). Cette part d'héritabilité dans la survenue de ces pathologies est toutefois assez mal définie puisque selon les études, elle varierait de 20 à 80% (a J. Marian & Belmont, 2011).

Concrètement, cela permet de chercher dans le génome entier des associations à un ou des phénotypes particuliers sans avoir besoin de poser au préalable des hypothèses sur d'éventuels mécanismes ou gènes candidats. Habituellement, une étude se décompose en quatre étapes : sélection d'un grand nombre de sujets atteints de la pathologie et de leurs contrôles, réalisation et analyse des génotypages, tests statistiques et enfin, réplication des associations identifiées dans des populations indépendantes ou études fonctionnelles au laboratoire. Une des perspectives de ces études est de pouvoir créer des sets de SNP afin de réaliser des **scores de risque génétique** qui pourraient suppléer les bilans biologiques standards. En effet, un génotype ne varie pas et est déterminé à la naissance ce qui permet d'éliminer toute variabilité biologique intra-individuelle.

ii. Limites :

Malgré l'apport considérable de ces GWAS dans la découverte de nouveaux SNP et donc dans la possibilité d'évaluer le risque génétique de développer une pathologie, l'ensemble des liens n'est pas totalement exploré. Cette part génétique non connue pour l'instant s'appelle **l'héritabilité manquante**. Les pistes à explorer pour tenter de l'expliquer ont été présentées par Prins BP en 2012 (Prins, Lagou, Asselbergs, Snieder, & Fu, 2012) :

SNP fréquents avec très peu d'effet : leur très faible impact individuel empêche une détection facile, il faudrait en détecter un très grand nombre pour que leurs effets cumulés soient visibles. Le nombre de sujets étudiés devant être de plus très important pour avoir une puissance statistique meilleure, des consortia se sont formés afin d'établir des méta-analyses pour combiner l'ensemble des données. C'est le cas, par exemple, du Myocardial Infarction Genetics Consortium (MIGen), de CARDIoGRAM ou du Coronary Artery Disease genetics consortium dans le domaine des pathologies coronariennes. Ce consortium a pour but de regrouper les données de multiples GWAS (publiées ou non et ayant trait aux pathologies coronariennes et à l'IDM) portant sur des individus d'origine européenne (plus de 22 000 cas et de 60 000 témoins) afin d'augmenter la puissance statistique (Preuss *et al*, 2010).

SNP rares avec un effet important : les SNP étudiés par les GWAS incluent majoritairement des SNP fréquents qui, en général, ne tagguent pas bien les SNP plus rares (<5% de fréquence). L'utilisation des nouvelles technologies à haut débit ou le façonnage maison de puces devrait ainsi permettre de découvrir de nouveaux variants.

Autres variants structurels : derrière les modifications d'un seul nucléotide, nous avons vu qu'il existait d'autres types de variations telles que des délétions ou des duplications et que ces variations structurales peuvent être regroupées sous le terme de CNV. Pourtant, jusqu'à présent, les GWAS ont échoué à trouver un lien entre CNV et pathologie coronarienne.

Interaction gène-gène ou épistasie : les premières études sont parties du principe qu'il n'existe pas d'interactions entre les allèles et que ces effets sont additifs. Cependant, certains auteurs rapportent que l'héritabilité manquante n'est pas uniquement liée à des variants non identifiés mais pourrait être due à une surestimation de l'influence de l'héritabilité à cause de l'absence de prise en compte des interactions génotype-génotype (A. J. Marian, 2012). Certains auteurs parlent même d'héritabilité fantôme pour parler de cette surestimation sans pour autant exclure l'existence de variants non encore découverts (Zuk, Hechter, Sunyaev, & Lander, 2012).

Interaction gène-environnement : il paraît logique de penser que les facteurs environnementaux peuvent impacter différentes pathologies et en particulier les maladies cardio-vasculaires. La physiopathologie de la maladie coronarienne est en effet influencée par des facteurs tels que le régime alimentaire, l'exercice, la qualité de l'air, le stress ou encore le tabac. Des exemples d'interaction entre un gène et l'environnement ont déjà été trouvés dans des maladies monogéniques comme l'expliquent MB Lanktree et RA Hegele dans leur revue (Lanktree & Hegele, 2009). En effet, il a été montré dans des familles de mormons que les porteurs de mutations sur le gène codant le récepteur aux LDL vivaient au XIX^{ème} siècle jusqu'à 80-90 ans au contraire de leurs descendants du XX^{ème} siècle qui meurent plus tôt aux environs de la quarantaine. L'explication avancée étant alors qu'à l'époque une plus grande activité physique et une alimentation moins riche en graisses permettait de compenser le défaut génétique. D'autres interactions sont par ailleurs mises en avant telle que l'influence du tabagisme chez les sujets porteurs de l'allèle $\epsilon 4$ sur la survenue d'évènements cardio-vasculaires et le taux de LDL oxydées par rapport aux non porteurs de cet allèle. Plusieurs modèles permettent de visualiser les différentes interactions possibles entre un gène et un facteur environnemental (voir figure 24). Nous pouvons penser que les interactions gène-gène abordées précédemment peuvent correspondre à un tel schéma interactionnel.

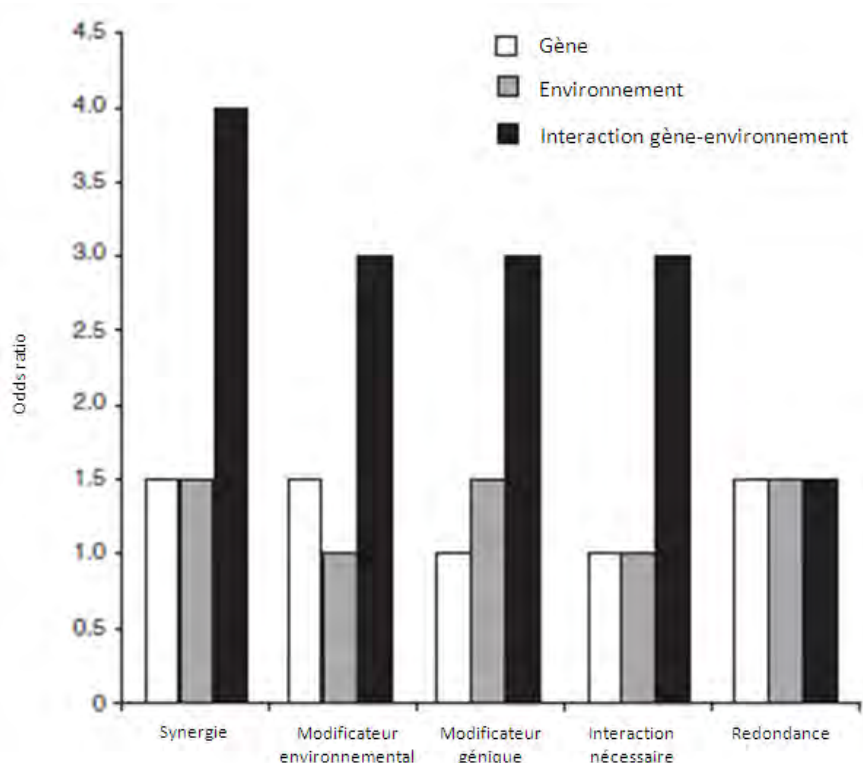


Figure 24 : interactions supposées possibles entre les gènes et l'environnement. D'après (Lanktree & Hegele, 2009).

Synergie : le gène et le facteur environnemental ont des effets indépendants sur la pathologie, l'interaction produit un effet synergique.

Modificateur environnemental : le facteur environnemental n'a pas d'effet sur la pathologie mais potentialise l'effet d'un gène qui en a déjà tout seul.

Modificateur génique : le facteur environnemental présente un effet qui est augmenté suite à l'interaction avec un gène qui tout seul n'a aucun impact.

Interaction nécessaire : ni le gène, ni le facteur environnemental n'ont un effet, c'est l'interaction entre les deux qui permet d'en avoir un.

Redondance : le gène et le facteur environnemental ont chacun un effet, l'interaction entre les deux ne produit pas d'effet additif.

Épigénétique : les modifications de la chromatine telles que des méthylations, acétylations ou phosphorylations peuvent affecter l'expression de gènes et sont ce que l'on appelle des modifications épigénétiques. Possiblement transmises aux générations suivantes, elles peuvent également être modifiées par des facteurs environnementaux tels que le stress, l'alimentation ou le tabac. Il est donc possible que ces modifications soient un facteur de plus pour expliquer la variabilité interindividuelle.

D'autre part, il ne faut pas oublier que l'identification va reposer sur des individus ayant des phénotypes extrêmes ce qui pourrait rendre plus difficile la détection de ces mêmes variants chez des individus ayant des dyslipidémies modérées.

B) Lien entre HDL et génétique :

Cette section est divisée en deux parties. La première nous permettra de voir l'ensemble des mutations monogéniques découvertes dans différentes familles ou individus de façon ponctuelle alors que la deuxième nous fera voir les découvertes récentes des études d'association génomique.

a. Mutations monogéniques et taux de HDL-C :

Les taux de HDL-C seraient génétiquement déterminés pour une part de 40 à 60% (Weissglas-Volkov & Pajukanta, 2010) expliquant que de nombreuses études familiales aient mis en évidence des désordres monogéniques portant sur des partenaires de son métabolisme. Caractérisés par des taux extrêmes de HDL-C, ces désordres se transmettent de façon autosomale (dominante ou récessive). Dans ce chapitre, seront spécifiés dès que possible les numéros permettant de classer les pathologies selon la base de données en ligne de l'Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM).

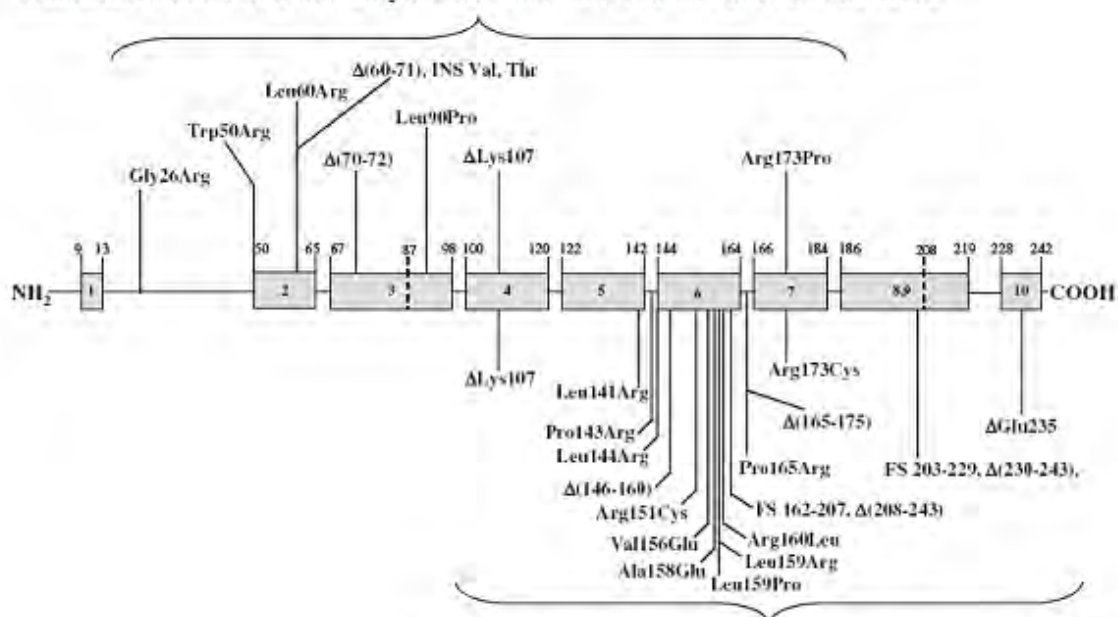
i. HypoHDLémie :

L'hypoalphalipoprotéinémie familiale est le plus fréquent des désordres génétiques touchant les taux de HDL-C.

1. Mutations du gène de l'apoA-I :

Les déficits en apoA-I se différencient des autres hypoHDLémies par des taux très bas d'apoA-I associés à des taux normaux de LDL-C ou de triglycérides. La présentation clinique est variée et diffère selon le lieu de la mutation, que le patient soit hétézygote, hétérozygote composite ou homozygote. Le gène de l'apoA-I se trouve sur le bras long du chromosome 11 (11q23-24) dans la même région que les gènes codant l'apoC-III et l'apoA-IV. De très nombreux variants ont été découverts mais aucun ne peut pour l'instant être qualifié de polymorphisme (voir figure 25).

Mutations associées à une amyloïdose familiale et à des taux bas de HDL



Mutations associées à une activation réduite de la LCAT et/ou à des taux bas de HDL

Figure 25 : Mutations de l'apoA-I responsables de phénotypes pathologiques. D'après (Zannis *et al*, 2006).

Les mutations faux-sens ou non-sens interfèrent avec la formation des particules HDL et engendrent une diminution « dose-dépendante » des taux de HDL-C avec une absence virtuelle de HDL chez les homozygotes et près de la moitié des valeurs normales chez les hétérozygotes. Les hétérozygotes n'ont pas, dans la plupart des cas, de signes cliniques spécifiques hormis lorsque les mutations se trouvent du côté N-terminal de la protéine, les patients présentant alors une symptomatologie d'amyloïdose familiale. Comme expliqué par A von Eckardstein (von Eckardstein, 2006), ces mutations entraînent l'accumulation de fragments d'apoA-I dans de nombreux organes tels que le foie, l'intestin ou encore les reins. Cette revue nous informe par ailleurs que, seuls les hétérozygotes composites ou les homozygotes, qui n'ont donc que très peu voire aucune apoA-I, présentent de façon typique des xanthomes ou des opacifications cornéennes (voir figure 26).

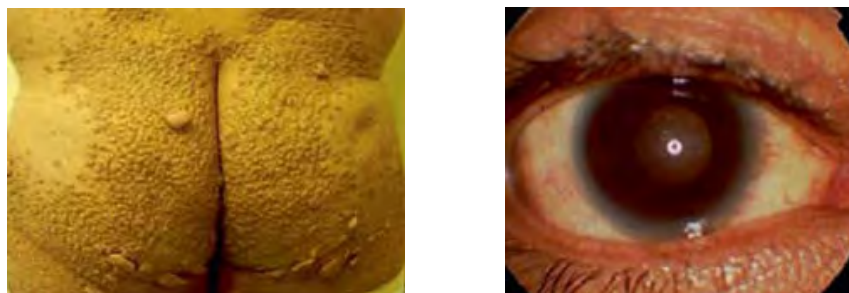


Figure 26 : Manifestations cliniques typiques de pathologies associées à des taux bas de HDL-C. A gauche, présence de xanthomes cutanés et à droite une opacité cornéenne. D'après (Rader & deGoma, 2012).

Des taux indétectables d'apoA-I ne sont pas toujours associés à un risque cardio-vasculaire accru comme en témoigne le cas rapporté par H Yokota (Yokota *et al*, 2002). Une femme de 69 ans, avec des taux d'apoA-I inférieurs à 0.6 mg/dL, un HDL-C compris entre 0.10 et 0.18 mmol/L associés à des taux de LDL-C élevés malgré un traitement par statines souffre également d'une hypertension artérielle et d'une intolérance au glucose. Cliniquement, les médecins lui trouvent une opacité cornéenne sans xanthomes ainsi qu'un électrocardiogramme normal. Seule la présence d'une plaque et d'un épaissement de l'épaisseur intima-média au niveau de l'artère carotidienne droite est notable. Le séquençage du gène de l'apoA-I montre une délétion, sur les deux allèles, d'une desoxycytidine au niveau du codon 184 responsable d'un décalage du cadre de lecture avec apparition d'un codon stop prématuré. Ce cas est donc remarquable dans le sens où, malgré la présence de nombreux facteurs de risque, cette patiente n'a jamais présenté d'épisode aigu de maladie coronarienne. Dans le même sens, nous pourrions citer l'exemple de l'**apoA-I Oita (Val156Glu ou V156E)** qui a également été découverte au Japon. Cette mutation retrouvée chez un patient de 67 ans est associée à des déficits profonds en apoA-I et en HDL ainsi qu'à une opacité cornéenne et une atteinte coronaire. L'activité de la LCAT et le taux d'estérification du cholestérol sont par ailleurs inférieurs à 40% de la normale. De façon intéressante, les acides aminés 143 à 164 de l'apoA-I sont impliqués dans le processus d'activation de la LCAT ce qui explique donc l'activité réduite de la LCAT de ce patient. Curieusement, ce patient homozygote pour cette mutation possède de nombreux facteurs de risque (indice de masse corporelle (IMC) à 27,5 kg/m², tabagisme à cinquante cigarettes par jour pendant cinquante ans) mais ne présente pas d'hypertrophie des amygdales ou de xanthomatose tendineuse. Son frère plus âgé, lui aussi homozygote, n'a jamais présenté de symptômes pouvant être reliés à une pathologie cardio-vasculaire (Huang *et al*, 1998). Cette

apoA-I mutante a par la suite été étudiée et semble plus stable que l'apoA-I sauvage. Elle se lie aussi moins bien aux phospholipides ce qui explique l'altération de la formation de pré- β HDL et donc l'incapacité à former des HDL matures (Cho & Jonas, 2000). Comme dernier exemple du paradoxe posé par des taux bas d'apoA-I sans pathologie athérosclérotique associée, l'apoA-I Milano paraît être l'exemple le plus connu et le mieux étudié. En effet, au début des années 1980 l'**apoA-I Milano** a été découverte dans un petit village d'Italie du nord (Limone sul Garda) chez trois membres d'une même famille qui présentaient une hypertriglycéridémie significative avec un taux de HDL-cholestérol très bas (7 à 14 mg/dL soit 0,07 à 0,14 g/L) sans qu'aucun membre ne souffre d'athérosclérose. Les activités de la LCAT et de la lipoprotéine lipase semblaient normales et les HDL étaient de taille significativement augmentée (environ 120 Å contre 90 Å pour les HDL contrôles) (Franceschini, Sirtori, Capurso, Weisgraber, & Mahley, 1980). L'analyse par électrophorèse a mis en évidence trois bandes correspondant à des apolipoprotéines de 28, 35 et 55 kDa : la bande à 28 kDa est celle de l'apoA-I différant de l'apoA-I normale par la présence d'une cystéine (variant dénommé apoA-I_{cys} ou apoA-I Milano), la bande à 55 kDa correspond à un homodimère d'apoA-I Milano (liaison par un pont disulfure) et enfin, la bande à 35 kDa correspond à un hétérodimère d'apoA-I Milano et d'apoA-II (Weisgraber, Bersot, Mahley, Franceschini, & Sirtori, 1980). Il a depuis été montré que cette apoA-I présente une mutation en position 173 où l'arginine est remplacée par une cystéine (**R173C**). Il semblerait que la perte de l'arginine soit responsable de la rupture du pont intra-hélical avec l'acide glutamique en position 169 déstabilisant ainsi la structure de la protéine et modifiant ses capacités de liaison avec les lipides. Cette perte de stabilité disparaît lors de la formation du dimère d'apoA-I avec la création d'un pont disulfure en position 173. Alors que les dimères et les monomères participent à la réaction avec ABCA1 afin de former des particules HDL naissantes, il semblerait que ce soient les dimères qui sont les plus efficaces dans le processus de captation. Finalement, il ressort que les taux d'apoA-I chez les personnes portant la mutation sont nettement plus bas que la normale à cause de la diminution d'affinité de l'apoA-I monomérique pour les lipides. Cette apoA-I participe alors au maintien d'un pool plus important d'apoA-I libres qui sont plus rapidement dégradées par le rein (Alexander *et al*, 2009). Cependant devant le phénotype protecteur conféré par cette mutation (Franceschini *et al*, 1999), des études complémentaires ont été réalisées. Alors que certaines ont montré que le sérum des malades ont une capacité d'efflux par ABCA1 qui est augmentée (Favari *et*

al, 2007; Franceschini *et al*, 1999), d'autres ont au contraire montré que cette capacité est équivalente à celle des sérums contrôles mais que l'apoA-I Milano possède une puissante activité anti-oxydante qui empêche l'oxydation des phospholipides par la lipoxigénase (Bielicki & Oda, 2002). La découverte de cette apoA-I tout à fait spéciale a permis, comme nous l'avons vu précédemment, le développement d'un nouvel axe de recherche pour cibler la pathologie dyslipidémique.

Il semblerait donc que la susceptibilité à développer une maladie coronarienne soit liée au type de mutation, à la présence de facteurs de risque, l'âge, le sexe ou encore le groupe ethnique.

2. Déficit en ABCA1 et maladie de Tangier (OMIM 205400) :

Ce déficit en ABCA1 est secondaire à la présence de mutations sur *ABCA1*, gène localisé sur le chromosome 9q31.1 qui est constitué de 50 exons (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>). Comme nous l'avons vu précédemment, c'est un transporteur responsable de l'efflux du cholestérol cellulaire et des phospholipides vers l'apoA-I, il joue donc un rôle crucial dans l'homéostasie du cholestérol cellulaire et dans la primo-lipidation de l'apoA-I, première étape du transport retour du cholestérol. Les mutations pertes de fonction affectant sa fonction d'efflux de cholestérol sont ainsi responsables d'un catabolisme accru de l'apoA-I qui voit son temps de demi-vie chuter, expliquant les taux indétectables d'apoA-I dans la circulation sanguine. Alors que de nombreuses mutations ont été jusqu'à présent décrites (plus de 100) (Weissglas-Volkov & Pajukanta, 2010), il a été montré dans la Copenhagen City Heart Study qu'environ 10% des individus ayant des taux de HDL très bas pour leur âge et leur sexe étaient hétérozygotes pour sept mutations non synonymes (Frikke-schmidt, 2010). A l'heure actuelle, seuls une centaine d'individus sont identifiés comme atteints de la maladie de Tangier (Frikke-schmidt, 2010).

Découverte dans les années 1960 lors d'une amygdalectomie chez un patient de cinq ans, cette maladie a été nommée d'après le nom de l'île où résidait cet enfant. Ses amygdales étaient de grande taille, lobulées et colorées en jaune. Sa sœur présentait également des amygdales d'apparence atypique, elles contenaient 50 à 100 fois plus d'esters de cholestérol que la normale. Ces deux patients index avaient également un profil

lipoprotéique remarquable caractérisé par des taux extrêmement bas de HDL-C (Hobbs & Rader, 1999).

De transmission autosomale récessive, les hétérozygotes (sans symptômes particuliers) ont des taux de HDL-C et d'apoA-I qui sont abaissés de 50% par rapport aux concentrations normales (Kral & Becker, 2007). Les homozygotes ont des taux très bas de HDL-C (<0.05 g/L) et d'apoA-I (environ 0.04 g/L), une élévation du taux de triglycérides (>2 g/L) et des taux de LDL-C diminués d'environ 50% (Weissglas-Volkov & Pajukanta, 2010). Lors du bilan biologique, une thrombocytopénie associée à une stomatocytose avec des invaginations de la membrane érythrocytaire sont également présentes (von Eckardstein, 2006). Plusieurs explications ont été avancées pour expliquer les taux de LDL-C abaissés (Hobbs & Rader, 1999) : la quasi absence de transport retour du cholestérol et donc l'absence d'apport de cholestérol au foie pourrait modifier le métabolisme hépatique en diminuant le contenu en cholestérol des précurseurs des LDL. Il est également possible que puisque les taux de HDL-C sont très bas, il n'y ait quasiment plus de transfert de cholestérol entre HDL et LDL/VLDL *via* la CETP ce qui conduit à la formation de LDL pauvres en cholestérol qui pourraient être dégradées plus rapidement que les LDL riches en cholestérol. Ces auteurs rapportent également un métabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides perturbé (VLDL et chylomicrons) avec des lipoprotéines déformées et de taille variable possiblement éliminées rapidement par le système réticulo-endothélial.

Les présentations cliniques sont différentes selon l'âge de découverte de la maladie. La présence de larges amygdales jaunes ou orangées est le symptôme pathognomonique de la maladie de Tangier. Il est retrouvé de façon prédominante chez les enfants et les adolescents (figure 27). Malgré une expression ubiquitaire d'ABCA1, il apparaît donc que l'accumulation de cholestérol est au départ restreinte aux cellules du système réticulo-endothélial, les autres types de cellules semblant mieux réguler leur contenu lipidique. Cette coloration typique est liée à l'accumulation de composés lipophiles comme les esters de vitamine E (teinte jaune) ou les caroténoïdes (teinte orange). Les adultes présentent souvent une hépatomégalie, une splénomégalie ainsi que des neuropathies d'expression et de type variables. Elles sont associées à l'accumulation de lipides dans les cellules de Schwann (cellules impliquées dans la myélinisation des neurones) ainsi qu'à une perte neuronale (Hobbs & Rader, 1999). Le risque de développer une pathologie cardio-vasculaire de façon

précoce existe mais il n'est pas tellement proportionnel à la baisse du HDL-C. Les homozygotes auraient un risque augmenté d'un facteur trois à six et les hétérozygotes un risque accru d'environ 1,5 fois (Weissglas-Volkov & Pajukanta, 2010). Toutefois, cette augmentation du risque n'est pas retrouvée dans toutes les familles (Frikke-schmidt, 2010) ceci pouvant être dû aux taux bas de LDL-C que présentent ces patients. De façon opposée, des taux élevés de LDL-C ont été retrouvés chez des malades ne présentant pas de signe précoce d'atteinte coronaire pointant ainsi un paradoxe apparent.



Figure 27 : Amygdales jaunes orangées typiques d'un patient atteint de la maladie de Tangier. D'après (Rader & DeGoma, 2012).

3. Déficit en LCAT :

Le gène de la LCAT comporte six exons et est situé sur le bras long du chromosome 16 (16q22.1). La transmission est autosomale récessive et très peu de cas sont recensés (description de 30 familles atteintes dans la littérature) avec une prévalence inférieure à 1 pour 1 000 000 (Savel *et al*, 2012). Deux pathologies liées à des mutations touchant ce gène sont retrouvées, elles sont différenciées par l'intensité du déficit enzymatique :

- Déficit en LCAT ou maladie de Norum (OMIM 245900) :

Le déficit en l'activité enzymatique de la LCAT est complet avec perte des activités α et β . Il est causé par un large spectre de mutations faux-sens et non-sens induisant un défaut de synthèse ou de sécrétion de la LCAT ou encore affectant son activité catalytique.

- Maladie des yeux de poisson (OMIM 136120) :

Le déficit est ici partiel avec perte uniquement de l'activité α . Les mutations sont limitées, elles sont non-synonymes et modifient la polarité de la protéine, interférant ainsi avec la liaison des lipoprotéines comportant de l'apoA-I.

Concernant le bilan biologique, les patients souffrant de l'une ou l'autre de ces pathologies présentent habituellement des taux bas de HCL-C ($<0.1\text{g/L}$ ou 0.3 mM) et d'apoA-I ($<0.5\text{g/L}$), ce qui n'est pas aussi bas que ce qui est retrouvé pour la maladie de Tangier ou les déficits en apoA-I. Ce qui est en revanche différent entre les deux formes cliniques, c'est la quantité de cholestérol non estérifié dans le plasma : 80 à 100% pour la maladie de Norum pour une normale inférieure à 30% *versus* un ratio normal ou légèrement élevé du rapport cholestérol non estérifié/cholestérol estérifié chez les malades aux yeux de poisson (von Eckardstein, 2006). Ce défaut de formation d'esters de cholestérol est responsable de l'absence de particules HDL matures, d'une clairance rapide de l'apoA-I avec seulement des particules HDL discoïdales présentes dans le plasma (Weissglas-Volkov & Pajukanta, 2010). Les concentrations en lipoprotéines contenant de l'apoB peuvent être élevées mais c'est surtout leur composition qui est anormale (Rader & DeGoma, 2012).

Cliniquement, l'opacification cornéenne est d'installation progressive et est caractéristique de ces déficits, elle n'affecte pas la vision dans la plupart des cas (figure 28). Plus grave, l'anémie hémolytique (fragilité érythrocytaire due au contenu anormal en lipides membranaires) qui se développe est associée à une protéinurie ainsi qu'à l'installation progressive d'une insuffisance rénale. Celle-ci est d'ailleurs la première cause de morbi-mortalité. Concernant le risque de développer une maladie coronarienne de façon précoce, là encore tout n'est pas aussi évident que la diminution des taux de HDL-C le laisse penser. Des études conflictuelles ont été publiées mais la plupart de ces études étaient petites et n'ont pas étudié l'ensemble des protéines et enzymes affectant le métabolisme du transport retour du cholestérol (Savel *et al*, 2012).

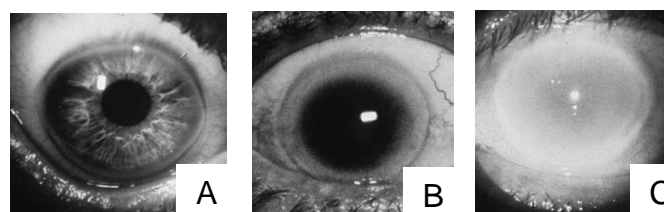


Figure 28 : Différents degrés d'opacification cornéenne. A : patient de 19 ans, B : patient de 56 ans, C : patient de 67 ans. D'après (von Eckardstein, 2006).

4. Déficit en LPL (OMIM 238600) :

Le gène codant la lipoprotéine lipase est situé sur le chromosome 8 en 8p22 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>), il est composé de dix exons et code une protéine de 475 acides aminés qui devient mature après clivage d'un peptide signal de 27 résidus. Pour rappel, cette protéine possède une activité enzymatique d'hydrolyse des triglycérides présents dans les chylomicrons et les VLDL, permettant ainsi de baisser les taux plasmatiques de triglycérides. Différentes mutations ont pu être identifiées et le mode de transmission a été défini comme étant autosomal récessif. La prévalence est ici encore très faible (1 pour 1 000 000).

Le tableau clinico-biologique observé chez ces patients est une hypertriglycémie sévère (accumulation de chylomicrons et de VLDL), des taux très bas de LDL-C et HDL-C (<20mg/dL), une hépatosplénomégalie, des xanthomes ainsi que des épisodes récurrents de douleurs abdominales ou de pancréatites aiguës (Weissglas-Volkov & Pajukanta, 2010). Ces individus ne sont pas à risque accru de souffrir d'une pathologie coronarienne (Kral & Becker, 2007; Weissglas-Volkov & Pajukanta, 2010).

ii. **HyperHDLémie :**

Les hyperalphalipoprotéinémies (HALP) familiales sont définies par un contexte familial d'élévation des taux de HDL-C au-delà du 90^{ème} percentile pour l'âge et le sexe, en dehors de toute cause secondaire (alcool ou médicament par exemple).

1. Déficit en CETP (OMIM 118470) :

Des mutations de cette enzyme peuvent être responsables d'une perte d'activité ce qui va ainsi impacter les différentes classes de lipoprotéines. Lors de la perte complète de son activité, une accumulation d'esters de cholestérol dans les HDL est observée ainsi

qu'une réduction du catabolisme des apoA-I et apoA-II (Kral & Becker, 2007). A l'inverse, les taux de LDL-cholestérol vont avoir tendance à diminuer (figure 29).

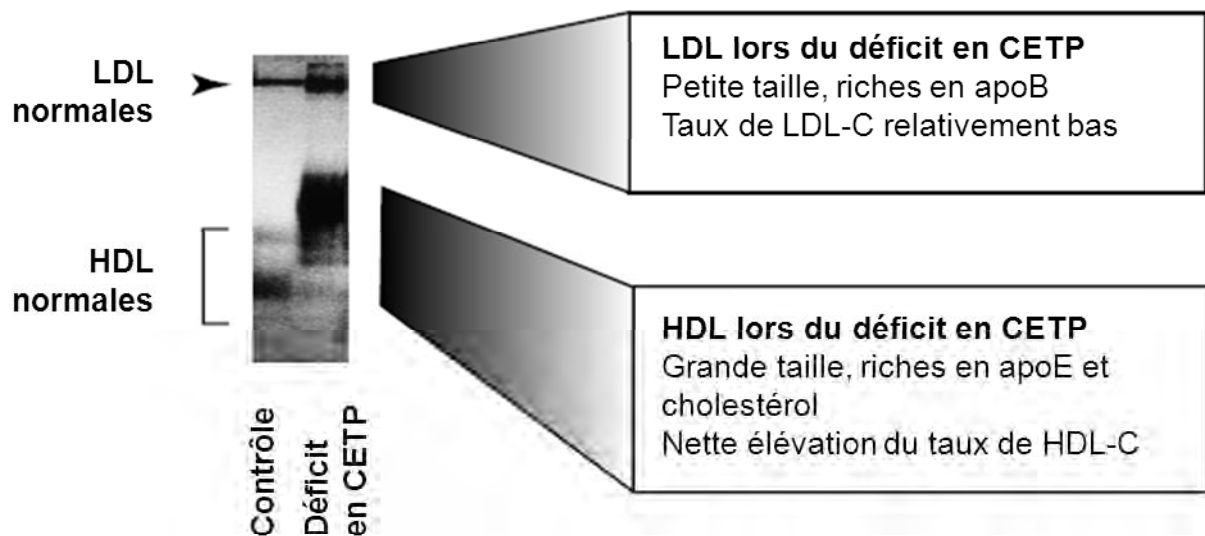


Figure 29 : Électrophorèse des lipoprotéines plasmatiques ($d < 1.210 \text{ g/mL}$) sur gel de polyacrylamide en conditions non dénaturantes. D'après (K Hirano, Yamashita, & Matsuzawa, 2000).

Présent sur le chromosome 16 (16q21), son gène est composé de 16 exons et code une protéine de 493 acides aminés qui devient mature après excision des 17 résidus du peptide signal. La plupart des cas de déficit en CETP ont été décrits au Japon où ils pourraient expliquer presque la moitié des cas d'hyperalphalipoprotéïnémie (Weissglas-Volkov & Pajukanta, 2010). De très nombreuses variations de ce gène avaient déjà été retrouvées dans des études de population bien avant l'utilisation courante des nouvelles technologies (figure 30) et la transmission est autosomale codominante.

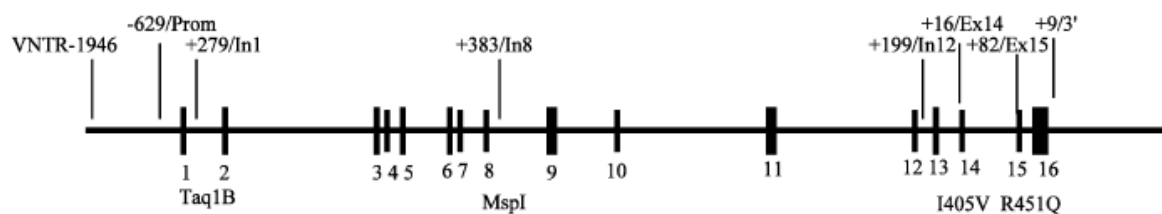


Figure 30 : Structure du gène de la CETP avec la localisation des polymorphismes les plus fréquents. D'après (Thompson *et al*, 2003).

Parmi les mutations recensées, le SNP rs708272 situé dans le premier intron et plus communément appelé **Taq1B** (ou TaqIB) est celui qui a été le plus souvent investigué dans

les études cliniques. Il existe deux allèles différents, le premier appelé *B1* possède un site de restriction pour TaqIB alors que l'allèle *B2* n'offre pas de site de restriction pour cette enzyme. Cet allèle *B2* est le moins fréquent des deux (environ 40%) et est associé à des taux plus bas de CETP. Une méta-analyse incluant 13 677 sujets a montré que les sujets *B2B2* ont des taux de HDL-C plus élevés de 0.11 mmol/L (IC50=0.10-0.12, $p<0.0001$) que les porteurs de deux allèles *B1*. Le génotype était aussi corrélé au risque cardio-vasculaire puisque les homozygotes *B2* semblaient plus protégés que les homozygotes *B1* avec un Odds Ratio à 0.78 (0.66-0.93) (S M Boekholdt *et al*, 2005). Ce lien n'est toutefois pas systématiquement retrouvé et l'effet de ce polymorphisme serait dépendant du sexe tout en étant influencé par l'alcool, l'IMC et l'insulinémie (de Grooth *et al*, 2004). Le lien de causalité entre ce polymorphisme et l'impact potentiel sur le profil lipoprotéique plasmatique n'est toujours pas clairement établi. Il est cependant possible que ce ne soit que le marqueur d'un autre polymorphisme situé 629 paires de bases en amont du site d'initiation de la transcription (-629C→A), le déséquilibre de liaison n'étant toutefois pas complet.

Un autre exemple possible de polymorphisme fréquemment exploré est la substitution d'une isoleucine par une valine en position 405 (**I405V**, rs5882). Celui-ci a été étudié en 2003 chez des juifs ashkénazes centenaires (Nir Barzilai *et al*, 2003). Sa fréquence allélique était de 0.46 chez les sujets étudiés contre 0.43 chez leurs descendants et 0.29 dans le groupe contrôle d'ashkénazes. Cela s'est traduit par une fréquence d'homozygotes beaucoup plus importante chez les sujets très âgés : 24.8% de génotype VV quel que soit le sexe chez les centenaires contre 8.6% dans le groupe contrôle. Le phénotype VV était associé à des tailles de particules LDL et HDL plus grandes par rapport aux phénotypes IV et II (21.29 nm vs 20.98 et 20.88 respectivement pour les LDL avec $p=0.002$ et 9.28nm vs 9.09 et 9.07 respectivement pour les HDL avec $p=0.02$) ainsi que des concentrations en CETP 17% plus basses. Ce même groupe a par la suite montré l'association entre le génotype VV et la préservation des fonctions cognitives chez les sujets âgés (N Barzilai, Atzmon, Derby, Bauman, & Lipton, 2006) ainsi que son association, dans une étude prospective de 593 individus, à une moindre incidence de démences (Hazard Ratio HR=0.28, IC95=0.10-0.85, $p=0.02$) et de maladies d'Alzheimer (HR=0.31, IC95=0.10-0.95, $p=0.03$) (Sanders *et al*, 2010). Cette mutation a en outre fait l'objet d'études dans le domaine cardiovasculaire et a révélé de façon curieuse un impact négatif. En 1998, une étude menée chez 576 hommes

d'ascendance japonaise, a montré que l'augmentation des taux de HDL chez les homozygotes VV était uniquement significative quand les triglycérides plasmatiques étaient supérieurs à 165 mg/dL. Et en dépit de l'augmentation de ces taux, la prévalence des CAD était plus forte que chez les sujets IV ou II (38% vs 27% vs 18%, $p < 0.05$) (Bruce, Sharp, & Tall, 1998). Une explication possible pourrait être que le taux de transfert d'esters de cholestérol depuis les HDL est déterminé par la quantité de CETP mais aussi par la quantité d'accepteurs (lipoprotéines riches en triglycérides comme les remnants de chylomicrons et les VLDL) (S Matthijs Boekholdt, Kuivenhoven, Hovingh, *et al*, 2004). Plus récemment, il a aussi été montré que ce polymorphisme est associé au risque coronarien chez les danoises ménopausées sans traitement hormonal substitutif puisque les homozygotes VV présentent un risque 2.1 fois plus élevé que leurs consœurs (IC95=1.3-3.4). Aucun effet n'a été trouvé chez les hommes. Les auteurs ont par ailleurs calculé que 24% du risque chez les femmes pouvait être attribué à cette mutation (Agerholm-Larsen, Nordestgaard, Steffensen, Jensen, & Tybjærg-Hansen, 2000).

Enfin, une autre mutation, bien que peu fréquente dans la population générale, a également suscité l'intérêt des chercheurs (Ken-ichi Hirano *et al*, 1997). Il s'agit d'une substitution (G→A) localisée dans l'**intron 14** au niveau d'un des sites d'épissage. Dans la ville d'Omagari au Japon, cette mutation est 20 fois plus retrouvée que dans le reste de la population et la prévalence des HALP majeures (HDL-C > 2.58 mmol/L ou 100 mg/dL) est également beaucoup plus fréquente (cinq à dix fois plus qu'ailleurs dans le pays). Paradoxalement, la fréquence de cette mutation (génératrice de taux plus élevés de HDL-C) était plus grande chez les sujets coronariens que chez les sujets sains. Dans le même ordre d'idée, elle était significativement plus basse chez les personnes âgées de plus de 80 ans que dans les générations plus jeunes. Cette même étude a également montré une relation en U entre les taux de HDL-C et l'incidence des dépressions du segment ST (signe d'ischémie myocardique). L'incidence augmente proportionnellement aux taux de HDL-C dès que ce taux dépasse 1.81 mmol/L (70 mg/dL) (figure 31). L'ensemble de ces résultats indiquant ainsi qu'une HALP secondaire à une mutation de la CETP pourrait ne pas être associée à une plus grande longévité.

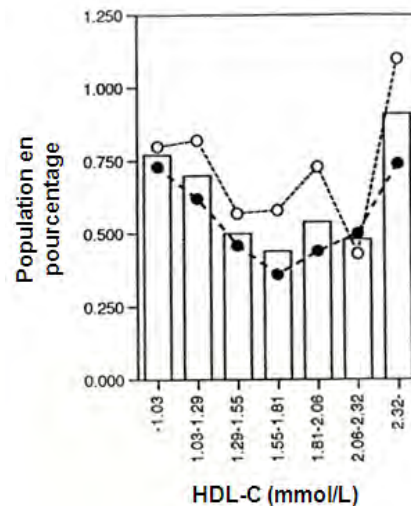


Figure 31 : Relation entre taux de HDL-C et incidence de la dépression du segment ST de plus de 1 mm. Histogrammes : dépression du segment ST chez tous les individus (n=104 505). Cercles vides : dépression du segment ST chez les hommes. Cercles pleins : dépression du segment ST chez les femmes. D'après (Ken-ichi Hirano *et al*, 1997).

A travers trois polymorphismes différents, pourtant responsables d'une moindre activité et/ou concentration de la CETP induisant une augmentation des taux et/ou de la taille des HDL, nous venons de voir que l'impact clinique était différent. Le rôle de la CETP est, dès le départ, ambigu puisque d'un côté elle est anti-athérogène (en facilitant le retour du cholestérol dans le foie *via* le LDLR) mais aussi pro-athérogène (en diminuant les concentrations de HDL-C). Il semblerait donc que ce soit l'état métabolique général qui conditionne l'effet de ces mutations. L'étude cas-témoins EPIC-Norfolk avait d'ailleurs montré qu'une forte activité de la CETP indépendamment de toute mutation, était associée à un risque accru de maladie coronarienne mais uniquement chez les sujets ayant un taux de triglycérides élevés (>1.7 mmol/L) avec un OR à 1.87 (IC95= 1.06-3.30, $p=0.02$) (S Matthijs Boekholdt, Kuivenhoven, Wareham, *et al*, 2004). D'autres études ont essayé d'évaluer si des mutations conjointes de la CETP (rs708272) et de la lipase hépatique que nous verrons dans le paragraphe suivant (rs1800588) sont capables de protéger contre la maladie coronaire puisqu'elles augmentent toutes les deux les taux de HDL-C. Malheureusement, aucun bénéfice à posséder les allèles permettant d'avoir des taux plus élevés de HDL-C n'a été démontré puisque les sujets B2B2/TT présentaient un risque accru de CAD (OR=3.7, $p=0.033$) (van Acker *et al*, 2008). Comme nous le verrons par la suite, les GWAS ont depuis permis de trouver d'innombrables variants associés aux taux de HDL faisant de la CETP un des gènes les plus fortement impliqués.

2. Déficit en lipase hépatique :

Localisé en 15q21-q23, le gène *LIPC* compte 1614 paires de bases et 9 exons. La séquence codante permet la traduction d'une protéine de 499 acides aminés qui devient mûre après excision d'un peptide signal de 22 acides aminés. Un déficit en lipase hépatique s'accompagne d'une hypertriglycémie et d'une élévation des taux de LDL-C et HDL-C (essentiellement HDL-2) (Kral & Becker, 2007). La principale mutation étudiée est un polymorphisme retrouvé dans le promoteur du gène (rs1800588, en -250 ou -514) qui est responsable d'une diminution de l'activité lipolytique de l'enzyme et de l'augmentation des taux de HDL-C (Isaacs, Sayed-Tabatabaei, Njajou, Witteman, & van Duijn, 2004; Zambon, Deeb, Hokanson, Brown, & Brunzell, 1998). Ces dernières décennies, plusieurs études cliniques ont voulu estimer la relation entre ce variant et le risque coronarien mais les résultats furent contradictoires (Dugi *et al*, 2001; Fan *et al*, 2009; Soyak *et al*, 2011; Andersen *et al*, 2003). Une méta-analyse portant sur 18 études et plus de 11000 cas a dernièrement conclu à l'absence d'association entre ce polymorphisme et les maladies cardio-vasculaires (H. Wang, Jiang, & Qiu, 2010).

3. Mutations portant sur SR-BI :

Chez l'homme, l'importance physiologique de ce récepteur clé pour la souris n'est toujours pas clairement établie. En dépit d'années de recherche, les scientifiques ont eu beaucoup de mal à mettre en évidence des mutations impactant les taux de HDL. Localisé en 12q24.31 chez l'homme, il existe deux transcrits du gène *SCARB1* codant deux isoformes différentes. L'isoforme un code une protéine de 509 acides aminés alors que l'isoforme deux code une protéine plus courte du côté C-terminal, la protéine traduite ayant 506 acides aminés. Toutefois, certaines familles ont pu être identifiées comme étant hyperHDLémiques secondairement à une mutation de SRBI. Une étude néerlandaise (Vergeer *et al*, 2011) a tout d'abord identifié une mutation faux-sens fonctionnelle (**P297S**) qui n'avait jamais été décrite auparavant. *SCARB1* avait tout d'abord été séquencé chez 162 sujets ayant des taux de HDL supérieurs au 95^{ème} percentile. L'identification d'un sujet ayant cette mutation inédite a alors amené cette équipe à également séquencer ce gène chez 124 membres de sa famille ; parmi eux, 19 étaient également porteurs de cette mutation. Leurs taux de HDL étaient plus élevés que les non-porteurs (1.82+/-0.49 mmol/L vs 1.38+/-0.33 mmol/L, p=0.001) et leurs macrophages présentaient une moindre capacité d'efflux du cholestérol. Cependant,

l'épaisseur intima-média carotidienne et le nombre d'évènements cardio-vasculaires étaient similaires entre les deux groupes même si peuvent être argués le faible nombre de sujets et leur jeune âge (moyenne d'âge de 45 ans environ). Autres faits notables : les plaquettes des sujets P297S étaient enrichies en cholestérol non estérifié et étaient moins facilement agrégables, la stéroïdogénèse était quant à elle diminuée avec des symptômes de déficit. Une deuxième étude menée chez 120 sujets sans lien de parenté et ayant des taux de HDL au-delà du 90^{ème} percentile a permis d'identifier deux nouvelles mutations non-sens, **S112F** et **T175A**, la fréquence des mutations de *SCARB1* pour l'ensemble de ces sujets étant de 1.2% (L R Brunham *et al*, 2011). Ces mutations étaient associées à une augmentation plasmatique des taux de HDL-C de 37% chez les porteurs hétérozygotes. Il n'y avait par ailleurs pas de preuve clinique d'athérosclérose accélérée. Dans cette même étude, le séquençage de *SCARB1* chez 80 sujets hypoHDLémiques (<10^{ème} percentile) n'avait par ailleurs rien donné.

D'autres travaux avaient auparavant cherché à identifier des variants, Acton *et al*, avaient notamment mis en évidence l'impact de certains polymorphismes sur des paramètres lipidiques et l'IMC chez 489 hommes et femmes espagnols. Le **rs4238001** (exon 1) était significativement associé à des HDL augmentées et des LDL diminuées chez les hommes mais pas chez les femmes ($p < 0.05$). Le variant de l'exon 8 (**rs5888**) était associé à une concentration en LDL plus basse chez les hétérozygotes et homozygotes variants par rapport aux sauvages (3.05 ± 0.98 mmol/L et 3.00 ± 0.93 mmol/L vs 3.39 ± 1.09 mmol/L, $p = 0.043$). Finalement, les femmes porteuses de l'allèle muté du **rs61932577** (intron 5) présentaient un IMC plus élevé que leurs homologues sauvages (23.8 ± 3.8 kg/m² vs 22.4 ± 3.4 kg/m², $p = 0.031$). (Acton *et al*, 1999). Parmi les trois mutations citées, le rs5888 a été celui le plus largement investigué mais son association aux taux de HDL a été uniquement significative parmi des hommes caucasiens, des femmes amishs et des caucasiens coronariens (Nock & Chandran Pillai, 2009). Une étude plus récente a toutefois montré que l'association avec le profil lipoprotéique et le risque myocardique dépendrait de l'âge et du sexe (Stanislovaitiene *et al*, 2013).

Nous venons de voir dans cette partie sur les hyperHDLémies que bien que des mutations aient été identifiées comme étant responsables d'augmentation des taux plasmatiques de HDL, aucune n'est clairement associée à un impact sur la maladie

coronarienne au contraire de ce que nous avons vu lors des hypoHDLémies où des mutations responsables d'une diminution des taux d'apoA-I ou de HDL étaient le plus souvent associées à une augmentation nette du risque cardio-vasculaire. Cela souligne donc une fois encore qu'une augmentation quantitative des HDL n'est pas forcément bénéfique et qu'il faut regarder les raisons de leur augmentation avant de pouvoir anticiper l'impact sur le processus athéromateux et ses conséquences cliniques.

b. L'approche multigénique des GWAS pour prédire les taux de HDL-C :

Dans la population générale, une simple mesure du taux de HDL-C ne donnant pas une information exhaustive de leur athérogénicité, il est maintenant nécessaire d'affiner ce que l'on connaît sur la génétique des HDL. Dans cette optique et à ce jour, une dizaine d'études pangénomiques ciblant des populations d'ascendance européenne ont étudié les liens entre des centaines de milliers de SNP et les taux de HDL-C (Aulchenko *et al*, 2009; Heid *et al*, 2008; Kathiresan *et al*, 2008, 2009; Ridker *et al*, 2009; Sabatti *et al*, 2009; Teslovich *et al*, 2010; K. Wang *et al*, 2011; Waterworth *et al*, 2010; Willer *et al*, 2008). Parmi elles, figure notamment une méta-analyse de 46 études génétiques qui a permis de mettre en avant l'association de 95 loci avec les lipides sanguins chez plus de 100 000 individus (Teslovich *et al*, 2010). Au total, environ 2.6 millions de SNP ont été testés pour leur association avec chacun des traits lipidiques sanguins habituels (cholestérol total, cholestérol HDL et LDL, triglycérides). Alors que 36 des loci avaient précédemment été identifiés, 39 ont pour la première fois montré une association avec les taux de cholestérol total, 22 avec ceux du LDL-C, 16 pour les triglycérides et 31 avec les niveaux de HDL-C. Au total, une association avec le HDL-C a été trouvée pour 47 loci et les associations les plus fortes sont avec des acteurs déjà connus du métabolisme du HDL : **CETP**, **lipase hépatique** et **lipoprotéine lipase** (tableau 16).

Gène proche	Numéro de SNP	Chromosome	Fréquence allélique	Effet en mg/dL (déviati�n standard)	p	Retrouvé dans d'autres GWAS
<i>PABPC4</i> poly(A) binding protein, cytoplasmic 4 (inducible form)	rs4660293	1	A, G (0.23)	-0.48 (0.09)	3.99×10^{-10}	Non
<i>ZNF648</i> zinc finger protein 648	rs1689800	1	A, G (0.35)	-0.47 (0.08)	3.18×10^{-10}	Non
<i>GALNT2</i> UDP-N-acetyl-alpha-D- galactosamine:polypeptide N- acetylgalactosaminyltransferase 2	rs4846914	1	A, G (0.40)	-0.61 (0.07)	3.66×10^{-21}	Oui
<i>APOB</i> apolipoprotein B	rs1042034	2	T, C (0.22)	0.90 (0.09)	1.22×10^{-30}	Oui
<i>COBLL1</i> cordon-bleu WH2 repeat protein-like 1	rs12328675	2	T, C (0.13)	0.68 (0.12)	2.72×10^{-10}	Oui
<i>IRS1</i> insulin receptor substrate 1	rs1515100	2	A, C (0.37)	0.46 (0.08)	2.01×10^{-09}	Non
<i>SLC39A8</i> solute carrier family 39 (zinc transporter), member 8	rs13107325	4	C, T (0.07)	-0.84 (0.16)	7.20×10^{-11}	Non

<i>ARL15</i> ADP-ribosylation factor-like 15	rs6450176	5	G, A (0.26)	-0.49 (0.09)	4.98×10^{-08}	Non
<i>C6orf106</i> chromosome 6 open reading frame 106	rs2814944	6	G, A (0.16)	-0.49 (0.10)	3.81×10^{-09}	Non
<i>CITED2</i> Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 2	rs605066	6	T, C (0.42)	-0.39 (0.08)	2.55×10^{-08}	Non
<i>LPA</i> lipoprotein, Lp(a)	rs1084651	6	G, A (0.16)	-0.56 (0.10)	2.97×10^{-08}	Non
<i>MLXIPL</i> MLX interacting protein-like	rs17145738	7	C, T (0.12)	0.57 (0.12)	1.19×10^{-09}	Non
<i>KLF14</i> Kruppel-like factor 14	rs4731702	7	C, T (0.48)	0.59 (0.07)	1.21×10^{-15}	Non
<i>PPP1R3B</i> protein phosphatase 1, regulatory subunit 3B	rs9987289	8	G, A (0.09)	-1.21 (0.13)	6.40×10^{-25}	Non
LPL lipoprotein lipase	rs12678919	8	A, G (0.12)	2.25 (0.12)	9.71×10^{-98}	Oui

<i>TRPS1</i> trichorhinophalangeal syndrome I	rs2293889	8	G, T (0.41)	-0.44 (0.08)	5.77×10^{-11}	Non
<i>TRIB1</i> tribbles pseudokinase 1	rs10808546	8	C, T (0.44)	0.61 (0.07)	6.35×10^{-19}	Non
<i>TTC39B</i> tetratricopeptide repeat domain 39B	rs643531	9	A, C (0.14)	-0.72 (0.10)	1.30×10^{-13}	Oui
<i>ABCA1</i> ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 1	rs1883025	9	C, T (0.25)	-0.94 (0.09)	1.75×10^{-33}	Oui
<i>AMPD3</i> adenosine monophosphate deaminase 3	rs2923084	11	A, G (0.17)	-0.41 (0.10)	4.62×10^{-08}	Non
<i>LRP4</i> low density lipoprotein receptor-related protein 4	rs3136441	11	T, C (0.15)	0.78 (0.10)	3.48×10^{-18}	Non
<i>FADS1-2-3</i> fatty acid desaturase	rs174601	11	C, T (0.36)	-0.73 (0.08)	1.50×10^{-22}	Oui
<i>APOA1-C3-A4-A5</i> apolipoproteins	rs964184	11	C, G (0.13)	-1.50 (0.11)	5.21×10^{-47}	Oui
<i>UBASH3B</i> ubiquitin associated and SH3 domain containing B	rs7115089	11	C, G (0.37)	0.31 (0.08)	2.66×10^{-08}	Non

<i>PDE3A</i> phosphodiesterase 3A, cGMP-inhibited	rs7134375	12	C, A (0.42)	0.40 (0.08)	3.84×10^{-08}	Non
<i>LRP1</i> low density lipoprotein receptor-related protein 1	rs3741414	12	C, T (0.24)	0.46 (0.09)	1.64×10^{-08}	Non
<i>MVK-MMAB</i> mevalonate kinase et methylmalonic aciduria (cobalamin deficiency) cblB type	rs7134594	12	T, C (0.47)	-0.44 (0.07)	6.88×10^{-15}	Oui
<i>SBNO1</i> strawberry notch homolog 1	rs4759375	12	C, T (0.06)	0.86 (0.16)	7.50×10^{-09}	Non
<i>ZNF664</i> ZNF664 zinc finger protein 664	rs4765127	12	G, T (0.34)	0.44 (0.08)	2.89×10^{-10}	Non
<i>SCARB1</i> scavenger receptor class B, member 1	rs838880	12	T, C (0.31)	0.61 (0.09)	2.58×10^{-14}	Non
<i>LIPC</i> <i>Hepatic lipase</i>	rs1532085	15	G, A (0.39)	1.45 (0.08)	2.92×10^{-96}	Oui
<i>LACTB</i> lactamase, beta	rs2652834	15	G, A (0.20)	-0.39 (0.10)	8.75×10^{-09}	Non

CETP cholesteryl ester transfer protein, plasma	rs3764261	16	C, A (0.32)	3.39 (0.09)	7.10×10^{-380}	Oui
LCAT lecithin-cholesterol acyltransferase	rs16942887	16	G, A (0.12)	1.27 (0.11)	8.39×10^{-33}	Oui
CMIP c-Maf inducing protein	rs2925979	16	C, T (0.30)	-0.45 (0.08)	2.09×10^{-11}	Non
STARD3 StAR-related lipid transfer (START) domain containing 3	rs881844	17	G, C (0.34)	-0.51 (0.08)	2.84×10^{-14}	Non
ABCA8 ATP-binding cassette, sub- family A (ABC1), member 8	rs4148008	17	C, G (0.32)	-0.42 (0.08)	1.79×10^{-10}	Non
PGS1 PGS1 phosphatidylglycerophosphate synthase 1	rs4082919	17	T, G (0.48)	-0.40 (0.08)	4.98×10^{-09}	Non
LIPG <i>Lipase endothéliale</i>	rs7241918	18	T, G (0.17)	-1.31 (0.10)	2.73×10^{-49}	Oui
MC4R melanocortin 4 receptor	rs12967135	18	G, A (0.23)	-0.42 (0.09)	6.58×10^{-09}	Non

<i>ANGPTL4</i> angiopoietin-like 4	rs7255436	19	A, C (0.47)	-0.45 (0.08)	3.25×10^{-08}	Oui
<i>LOC55908</i> dedicator of cytokinesis 6	rs737337	19	T, C (0.08)	-0.64 (0.14)	3.10×10^{-09}	Non
<i>APOE-C1-C2</i> apolipoprotéine	rs4420638	19	A, G (0.17)	-1.06 (0.12)	4.40×10^{-21}	Oui
<i>LILRA3</i> leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily A (without TM domain), member 3	rs386000	19	G, C (0.20)	0.83 (0.11)	4.29×10^{-16}	Non
<i>HNF4A</i> hepatocyte nuclear factor 4, alpha	rs1800961	20	C, T (0.03)	-1.88 (0.24)	1.05×10^{-15}	Oui
<i>PLTP</i> Phospholipid Transfer Protein	rs6065906	20	T, C (0.18)	-0.93 (0.10)	1.90×10^{-22}	Oui
<i>UBE2L3</i> ubiquitin-conjugating enzyme E2L 3	rs181362	22	C, T (0.20)	-0.46 (0.09)	1.11×10^{-08}	Non

Tableau 16 : Lien entre SNP et taux de HDL-C. Sont notés en rouge, les SNP présentant les plus fortes associations. Adapté de (Teslovich *et al*, 2010).

L'ensemble de ces SNP expliquerait 12.1% de la variance du HDL-C soit environ 25-30% de la variation génétique pour ce trait. Parmi les loci proches de gènes dont on ne connaît pas encore l'implication dans le métabolisme du cholestérol HDL, Teslovich *et al* (Teslovich *et al*, 2010) se sont intéressés au SNP rs4846914 situé dans un des introns de **GALNT2**. Ce gène code une enzyme qui transfère une N-acétylgalactosamine vers le groupement hydroxyl des sérine et thréonine suggérant un rôle potentiel dans la glycosylation enzymatique de certaines protéines du métabolisme des HDL (et pourquoi pas des apolipoprotéines elles-mêmes). Il se trouve d'ailleurs que sa surexpression hépatique chez des souris entraîne une baisse significative du taux de HDL-C de 24% à quatre semaines. A l'inverse, une baisse de son expression de 95% par un vecteur viral résulte en une augmentation des taux de HDL-C de 71% à quatre semaines. La surexpression de **PPP1R3B** (codant la sous-unité régulatrice de la protéine phosphatase 1) et l'invalidation de **TTC39B** (codant le tetratricopeptide repeat domain 39B, fonction inconnue chez l'homme) modulent également les taux de HDL-C chez la souris à plus ou moins court terme (effet à quatre jours pour TTC39B et deux semaines pour PPP1R3B) montrant ainsi le rôle auparavant insoupçonné d'acteurs n'ayant *a priori* peu à voir avec les HDL. De même, une association est retrouvée avec un SNP localisé dans un des introns de **MMAB**, gène synténique de **MVK** qui code la mévalonate kinase, enzyme clé dans la biosynthèse du cholestérol. Bien que l'implication de MMAB dans le métabolisme du cholestérol soit floue, ces deux gènes sont régulés de façon similaire par SREBP-2 (Sterol Regulatory Element Binding Protein-2) (C. Murphy, Murray, Meaney, & Gåfvels, 2007). Parmi d'autres connections possibles, on peut citer **HNF4A**, facteur de transcription nucléaire, impliqué dans les diabètes de l'adulte jeune mais qui régule aussi certains partenaires du cholestérol comme le cytochrome 7A1, l'expression des transporteurs des acides biliaires ou le récepteur SR-BI chez la souris (Crestani *et al*, 2004; Hayhurst, Lee, Lambert, Ward, & Gonzalez, 2001). Un SNP localisé près du gène **IRS1** (codant le substrat 1 du récepteur de l'insuline) et dont des mutations ont déjà été retrouvées associées à un risque accru de diabète de type II, d'insulinorésistance et d'hyperinsulinémie (Rung *et al*, 2009), est également retrouvé chez Teslovich (Teslovich *et al*, 2010) associé à des taux plus élevés de HDL-C. Le SNP lié à **ANGPTL4** est quant à lui à la limite de la significativité et bien que ce son rôle ne soit pas clairement établi, on sait qu'il inhibe l'activité de la lipoprotéine lipase chez la souris (K. Yoshida, 2002). Un lien avec l'inflammation est également retrouvé avec **SLC39A1** qui code un transporteur cellulaire du

zinc dont l'expression est induite par le TNF- α (Waterworth *et al*, 2010) mais aussi avec la **paraxononase-2** (rs7493) (Edmondson *et al*, 2011). Enfin, il est intéressant de voir que des gènes codant des protéines à doigt de zinc sont également associées aux taux de HDL-C, c'est le cas des **ZNF648** et **664**. Leur fonction exacte est inconnue, mais le gène codant une autre protéine à doigt de zinc, la ZNF202, qui régule la transcription de gènes impliqués dans le transport retour du cholestérol (*ABCA1*, *ABCG1*, *LCAT*, *PLTP* ou *LIPC* par exemple) possède des mutations qui sont associées de façon inconstante à une modulation des taux de HDL-C (Razzaghi, Santorico, & Kamboh, 2012; Stene, Frikke-Schmidt, Nordestgaard, & Tybjaerg-Hansen, 2006). Une méta-analyse plus récente a depuis été publiée en 2012 et prend en compte 32 études de plus de 66 000 individus d'origine européenne (Asselbergs *et al*, 2012). Elle a identifié et répliqué cinq SNP auparavant non retrouvés liés aux taux de HDL-C. Figurent notamment le rs12631819 (intron de **PPARG**), le rs11236530 (intron de **DGAT2**) et le rs4759361 (proche de **HCAR2**). Les variants associés aux deux premiers SNP régulent négativement les taux de HDL-C alors que le dernier est associé positivement à leur taux. Ces trois gènes sont connus pour leur action métabolique puisque l'activation de *PPARG* est en lien avec l'insulino-sensibilisation, *HCAR2* code le récepteur pour la niacine et *DGAT2* code l'enzyme essentielle pour la biosynthèse des triglycérides dans le foie.

À côté de ces études ayant voulu mettre en évidence des liens entre **taux** de HDL-C et marqueurs génétiques, d'autres investigations ont été faites afin de lier **composition** et **taille** des particules HDL avec variants génétiques. Là encore, ce sont majoritairement des mutations de gènes majeurs du métabolisme HDL que nous retrouvons avec le contenu en triglycérides des très larges HDL qui est liée à des mutations de *LIPC* et de la *CETP* (rs35853021 et rs7228085 respectivement) ou du contenu en lipides qui est associé à une mutation de la *PLTP* (rs6065904) (Kettunen *et al.*, 2012). AK Petersen *et al* ont dissocié 15 sous-fractions lipoprotéiques dans plus de 1700 échantillons par spectroscopie à résonance magnétique nucléaire et ont également montré que des loci situés en amont des gènes de la *CETP*, de *LIPC* (rs1532085 et rs3764261) ou situés dans la *PLTP* (rs6065906) sont associés à la taille des HDL (Petersen *et al*, 2012). Une GWAS de 2009 a en outre mis en évidence un nouveau lien avec un des loci de *GCKR* (glucokinase (hexokinase 4) regulator) et la taille des HDL sans qu'il n'y ait d'association aux taux de HDL-C. Ce gène code une protéine inhibitrice de la glucokinase dans le foie et qui constitue un gène candidat de susceptibilité au MODY

(Chasman *et al*, 2009). Enfin, une dernière publication a montré le lien entre rs2246416 (dans l'intron du gène codant la fibuline 5) et augmentation de la taille moyenne des particules HDL. Le lien de causalité n'est toujours pas établi et n'a pas été répliqué dans d'autres cohortes mais ce polymorphisme pourrait affecter l'activité de la superoxyde dismutase et modifier ainsi l'état oxydatif dans le mur artériel (Kaess *et al*, 2011).

Nous voyons donc que d'un côté les GWAS confirment l'importance de certains gènes (*CETP*, *LPL*, *LIPC*, *LIPG*, *ABCA1*, *LCAT*...) dans le métabolisme du HDL et dans le maintien de leur taux tout permettant d'identifier de nouveaux gènes candidats. Cependant, les liens de causalité entre présence d'un polymorphisme et impact sur les taux de HDL-C ne sont pas clairs, cela demande en effet des études plus poussées afin de caractériser leur importance et leur fonction. Il faut de plus garder à l'esprit la possibilité de faux positifs possibles notamment avec les associations n'ayant pas pu être répliquées dans d'autres populations ainsi que les profils des groupes pris en compte (diabétiques, femmes, ...).

C) Existe-t-il un lien entre les SNP modulant les taux de HDL-C et le risque coronarien ?

Au-delà de la recherche du lien entre polymorphismes et taux de HDL-C, il est nécessaire d'établir les liens possibles entre ces polymorphismes et le risque coronarien. C'est ce qui a été étudié dans certaines des GWAS que nous avons vues précédemment. Teslovich *et al* (Teslovich *et al*, 2010) ont notamment évalué l'effet des loci qu'ils venaient de découvrir chez 24607 coronariens d'ascendance européenne et 66197 contrôles indemnes de pathologie cardio-vasculaire. Cela leur a permis d'identifier trois nouveaux loci associés aux taux de HDL-C mais aussi à la maladie coronarienne, ceux-ci sont en lien avec *IRS-1*, *C6orf106* (chromosome 6 open reading frame 106) et *KLF14* (Kruppel-like factor 14). Alors que la fonction du gène *in vivo* de *C6orf106* n'est toujours pas connue, *KLF14* code un facteur de transcription dont l'expression est induite par la TGF- β . Toutefois, il n'existe pas forcément un lien de causalité entre modulation des taux de HDL-C et risque coronarien pour ces trois gènes là. Les modulations des taux de HDL-C ne sont peut-être en effet qu'une association à des effets pléiotropes que l'on ne connaît pas encore forcément. D'autres loci influençant les taux de HDL-C s'associent également au risque coronarien, c'est le cas du

rs708272 (proche de la *CETP*) dans une cohorte de 18245 américaines initialement en bonne santé (Ridker *et al*, 2009).

Deux études de **randomisation mendélienne** ont récemment remis en cause le rôle du cholestérol HDL dans sa participation à la protection du risque coronarien. La première a testé l'impact d'un SNP de la lipase endothéliale (**LIPG**, Asn396Ser) dans 20 études incluant plus de 20000 cas d'IDM et 95000 contrôles (Voight *et al*, 2012). Les porteurs de cette mutation avaient des taux plus élevés de HDL-C de 0.14 mmol/L mais un bilan lipidique et des facteurs de risque similaires aux autres sujets de l'étude. Alors que cette augmentation du HDL-C aurait dû être associée à une diminution du risque d'IDM de 13%, il n'y avait ici aucune réduction du risque. Le même principe a été appliqué pour étudier l'effet d'une mutation associée au gène de la **LCAT** (S208T, rs4986970) (Haase *et al*, 2012). Alors qu'épidémiologiquement une diminution de 0.21 mmol/L du HDL-C était associée à une augmentation du risque d'IDM de 18%, une diminution similaire des taux de HDL-C secondairement à la présence de la mutation de l'acide aminé 208 n'était pas associée à une augmentation du risque d'IDM. Les résultats de ces deux études ont donc totalement chamboulé la notion de cardio-protection apportée par le HDL-C en mettant en avant l'absence de causalité entre taux de HDL-C et IDM. Toutefois, ces études de randomisation mendélienne présentent des limites qu'il ne s'agit pas d'oublier afin de les interpréter au mieux. Il faut en effet que le phénotype intermédiaire (taux de HDL-C) soit associée à la survenue (IDM), que le variant s'associe à l'IDM uniquement à travers ses effets sur le HDL-C et, enfin, que la technique de génotypage permette d'éviter les biais instrumentaux (Harrison, Holmes, & Humphries, 2012). Une des principales limites possibles serait ici qu'il n'est pas possible d'exclure les autres effets de la LIPG et de la LCAT (effets anti-oxydants notables).

Des **cartes de score génétique** basées sur des algorithmes de prédiction du risque ont également vu le jour afin de prendre en compte l'effet de l'ensemble des loci. C'est ce qu'ont fait Voight *et al* (Voight *et al*, 2012) qui ont utilisé un score génétique incluant 14 SNP exclusivement associés au HDL-C (tableau 17 ci-après) qu'ils ont testé chez plus de 12400 cas d'IDM et plus de 40000 contrôles. Ils ont également testé, en guise de témoin, un score génétique équivalent pour évaluer l'impact du LDL en utilisant 13 SNP exclusivement associés au LDL-C. Les études épidémiologiques ont établi qu'une augmentation de 1 SD du

HDL-C est associée à une diminution du risque d'IDM (OR=0.62, IC95=0.58-0.66). Malheureusement, une augmentation de 1 SD due au score génétique n'était pas associée au risque d'infarctus myocardique (OR=0.93, IC95=0.68-1.26). En revanche, l'augmentation du risque associé à une augmentation du taux de LDL-C est concordante entre les études épidémiologiques et le score génétique ($p=2 \times 10^{-10}$). D'autres scores de risque ont également été créés par d'autres équipes mais en prenant en compte les variants également associés aux taux de LDL-C et de triglycérides. Par exemple, le score de risque génétique créé par Aulchenko YS *et al* (Aulchenko *et al*, 2009) permet d'expliquer 4.8% de la variabilité du bilan lipidique et est associé à une augmentation de l'épaisseur intima-média carotidienne ($p=0.001$) et du risque coronarien ($p=0.04$).

SNP	Localisation	Nom du gène	Fonction présumée
rs13107325	mutation faux-sens <i>SLC39A8</i>	solute carrier family 39 (zinc transporter), member 8	import cellulaire de zinc (début inflammation)
rs1689800	amont de <i>ZNF648</i>	zinc finger protein 648	régulation de la transcription (gènes ?)
rs16942887	intron de <i>PSKH1</i>	Protéine sérine kinase H1	phosphorylation
rs181362	intron de <i>UBE2L3</i>	ubiquitin-conjugating enzyme E2L3	ubiquitination de p53, c-Fos et p105 (NF-kB) <i>in vitro</i>
rs2293889	intron de <i>TRPS1</i>	trichorhinophalangeal syndrome 1	facteur de transcription qui réprime les gènes régulés par les séquences GATA
rs2923084	amont de <i>AMPD3</i>	adenosine monophosphate deaminase 3	déamination de l'AMP en IMP, isoforme érythrocytaire
rs386000	aval de <i>LILRA3</i>	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily A (without TM domain), member 3	immunorécepteur
rs4082919	intron de <i>PGS1</i>	phosphatidylglycérophosphate synthase 1	?
rs4759375	intron de <i>SBNO1</i>	strawberry notch homolog 1 (Drosophila)	?
rs7134594	intron de <i>MMAB</i>	acidurie méthylmalonique (déficit en cobalamine) type cblB	conversion de la vitamine B12 en adénosylcobalamine
rs7255436	intron de <i>ANGPTL4</i>	angiopoietin-like 4	régulation de l'homéostasie glucidique, du métabolisme glucidique, de l'insulinosensibilité et la survie endothéliale
rs737337	mutation synonyme <i>DOCK6</i>	dédicataire de la cytokinésie 6	réorganisation du cytosquelette d'actine (activation des Rho GTPases Cdc42 et Rac1)
rs838880	aval de <i>SCARB1</i>	scavenger receptor class B, member 1	transfert de cholestérol de et vers les HDL, récepteur de la glycoprotéine E2 du virus de l'hépatite C
rs881844	intron de <i>STARD3</i>	StAR-related lipid transfer (START) domain containing 3	trafic des lipides, possiblement export de cholestérol

Tableau 17 : SNP utilisés par Voight *et al* pour établir leur score de risque génétique (14 SNP exclusivement liés aux taux de HDL-C).

D'après (Voight *et al*, 2012).

Le risque coronarien n'étant pas seulement attribuable à des modifications du bilan lipidique, de nombreuses GWAS ont tenté de trouver des liens directs entre SNP et risque coronarien (C4D (the coronary artery disease) Genetics Consortium, 2011; Myocardial Infarction Genetics Consortium, 2009; R. S. Patel *et al*, 2012; Peden & Farrall, 2011; Samani *et al*, 2007; Schunkert *et al*, 2011; Wallace *et al*, 2008). D'autres ont utilisé les SNP découverts pour permettre de créer des scores de risque génétique afin de voir si cela permettait une meilleure classification des patients et un apport sur leur prise en charge (Davies *et al*, 2010; Hughes *et al*, 2012; Ripatti *et al*, 2010; Thanassoulis *et al*, 2012; Vaarhorst *et al*, 2012). A ce jour, 30 principaux variants de susceptibilité aux pathologies coronariennes ont été identifiés dans des populations d'origine européenne (tableau 18 ci-après) (Prins *et al*, 2012) mais leur effet combiné estimerait uniquement 10% de l'héritabilité totale (Schunkert *et al*, 2011). Toutefois, de nombreux loci en lien avec les divers facteurs de risque ont été identifiés dans ces GWAS (figure 32).

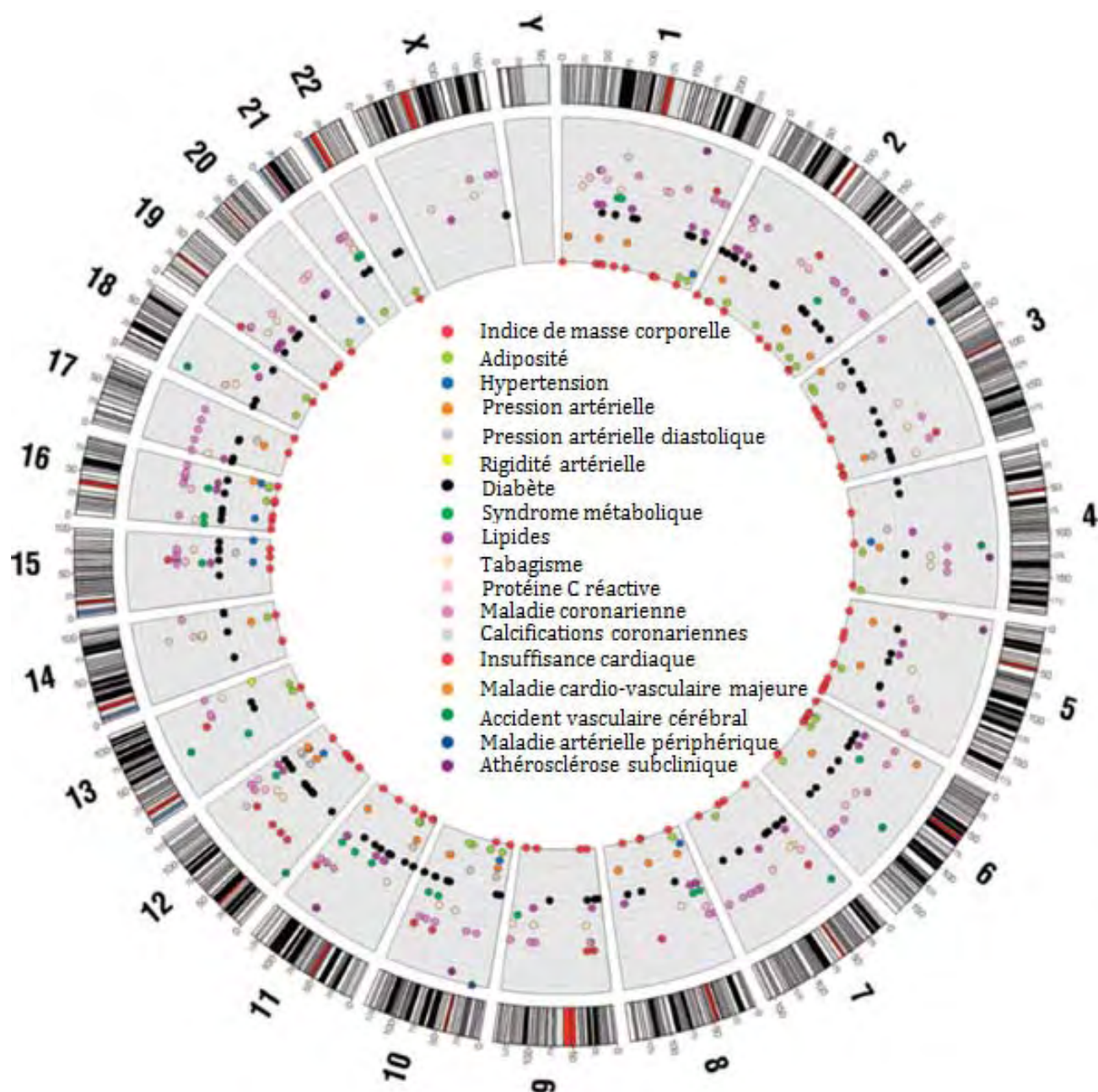


Figure 32 : Les variants identifiés dans les GWAS en lien avec les maladies coronariennes ou leur facteurs de risque et leur localisation chromosomique. D'après (Schnabel *et al*, 2012).

Région chromosomique	SNP	Odds ratio	Gènes	Association aux facteurs de risque connus
1p13.3	rs646776	1.19	<i>CELSR2, PSRC1, SORT1</i>	LDL, réponse aux statines, cholestérol total, activité et masse de la Lp-PLA2
1p32.2	rs17114036	1.17	<i>PPAP2B</i>	
1p32.3	rs11206510	1.15	<i>PCSK9</i>	LDL
1q41	rs17465637	1.14	<i>MIA3</i>	
2q33.1	rs6725887	1.17	<i>WDR12</i>	
3q22.3	rs9818870	1.15	<i>MRAS</i>	
6p21.31	rs17609940	1.07	<i>ANKS1A</i>	
6p21.33	rs3869109	1.14	<i>HCG27, HLA-C</i>	triglycérides
6p24.1	rs12526453	1.12	<i>PHACTR1</i>	
6q23.2	rs12190287	1.08	<i>TCF21</i>	
6q25.3	rs3798220	1.92	<i>SLC22A3, LPAL2, LPA</i>	taux de Lp(a)
7q22.3	rs10953541	1.08	<i>BCAP29</i>	
7q32.2	rs11556924	1.09	<i>ZC3HC1</i>	
9p21.3	rs4977574	1.29	<i>CDKN2A, CDKN2e</i>	anévrismes abdominaux de l'aorte, anévrismes intra-crâniens
9p21.3	rs7865618	1.18	<i>MTAPe</i>	diabète de type 2
9q34.2	rs579459	1.10	<i>ABO</i>	thrombo-embolisme veineux, niveaux de E-sélectines, niveau en phytostérol sériques
10p11.23	rs2505083	1.08	<i>KIAA1462</i>	histologie hépatique de stéatose hépatique non alcoolique
10q11.21	rs1746048	1.17	<i>CXCL12</i>	
10q23.2	rs1412444	1.1	<i>LIPA</i>	pression artérielle systolique
10q24.32	rs12413409	1.12	<i>CYP17A1, CNM2, NT5C2</i>	pression artérielle systolique, anévrismes intra-crâniens
11q22.3	rs974819	1.07	<i>PDGFD</i>	
11q23.3	rs964184	1.13	<i>ZNF259, APOA5-A4-C3-A1</i>	HDL, hypertriglycémie
13q34	rs4773144	1.07	<i>COL4A1, COL4A2</i>	
14q32.2	rs2895811	1.07	<i>HHL1</i>	

15q25.1	rs3825807	1.08	<i>ADAMTS7,</i> <i>MORF4L1f</i>	
17p11.2	rs12936587	1.07	<i>RASD1, SMCR3,</i> <i>PEMT</i>	
17p13.3	rs216172	1.07	<i>SMG6, SRR</i>	taille de la racine aortique, diabète de type 2
17q21.32	rs46522	1.06	<i>UBE2Z, GIP,</i> <i>ATP5G1, SNF8</i>	
19p13.2	rs1122608	1.15	<i>LDLR</i>	
21q22.11	rs9982601	1.20	<i>SLC5A3, MRPS6,</i> <i>KCNE2</i>	

Tableau 18 : Variants impliqués dans la susceptibilité à la maladie coronarienne. D'après (Prins *et al*, 2012). Les significations des principaux gènes sont données dans le tableau 19 ci-après.

Au final, bien que les mécanismes sous-jacents aux associations soient pour l'instant mal connus, la découverte de ces SNP est d'intérêt majeur puisque ces mutations pourraient être utilisées chez des individus jeunes qui ne présentent pas encore les facteurs de risque standards (FRS) (dyslipidémie, hypertension, diabète de type II). Une des options possibles serait de combiner FRS et facteurs de risque génétiques indépendants des FRS afin de bénéficier de l'apport de chacun de ces marqueurs. Dans ce sens, l'équipe de JPA Ioannidis a conçu une étude originale qui combine les deux types de facteurs de risque (voir liste des SNP utilisés dans le tableau 19). Elle a pour but d'évaluer si la connaissance du risque génétique par le patient améliore son observance au traitement par rapport aux patients connaissant uniquement leurs FRS (Knowles *et al*, 2012). En effet, après connaissance et acceptation du risque, il pourrait y avoir un impact positif sur l'adhésion au traitement en raison de la motivation à essayer de réduire le risque global.

SNP testés	Allèle à risque	Fréquence de l'allèle à risque	Chromosome	Gène(s) proche(s)	Odds Ratio
rs17465637	C	0,74	1	MIA3 melanoma inhibitory activity family, member 3	1,14
rs9970807	T	0,91	1	PPAP2B phosphatidic acid phosphatase type 2B	1,17
rs6725887	C	0,15	2	WDR12 WD repeat domain 12	1,17
rs2306374	C	0,18	3	MRAS muscle RAS oncogene homolog	1,15
rs12190287	G	0,76	6	TCF21 transcription factor 21	1,08
rs12204265	C	0,67	6	ANKS1A ankyrin repeat and sterile alpha motif domain containing 1A	1,07
rs12526453	C	0,62	6	PHACTR1 phosphatase and actin regulator 1	1,12

rs11556924	C	0,62	7	ZC3HC1 zinc finger, C3HC-type containing 1	1,09
rs4977574	G	0,46	9	CDKN2A, CDKN2B cyclin-dependent kinase inhibitor	1,28
rs1746048	C	0,87	10	CXCL12 chemokine (C-X-C motif) ligand 12	1,17
rs2246833	C	0,42	10	LIPA lipase A, lysosomal acid, cholesterol esterase	1,09
rs2505083	T	0,37	10	KIAA1462	1,07
rs974819	T	0,29	11	PDGFD platelet derived growth factor D	1,07
rs4773144	G	0,44	13	COL4A1, COL4A2 collagen, type IV	1,07
rs2895811	C	0,43	14	HHIPL1 HHIP-like 1	1,07
rs7177699	T	0,56	15	ADAMTS7 ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 7	1,08
rs12449964	C	0,56	17	RASD1, SMCR3, PEMT	1,07
rs143499	C	0,36	17	SMG6, SRR	1,07
rs9305545	A	0,16	21	SLC5A3, MRPS6, KCNE2	1,2

Tableau 19 : SNP indépendants des FRS associés aux CVD. SNP : Single Nucleotide Polymorphism. CVD : Cardiovascular disease. D'après (Knowles *et al*, 2012).

A l'heure actuelle, l'utilité clinique des SNP pour la prédiction du risque cardiovasculaire fait débat puisque les données ne permettent pas de répondre de façon précise à l'existence ou non d'une future pathologie (Di Angelantonio & Butterworth, 2012). De plus, l'identification de ces allèles repose sur des sujets ayant des phénotypes extrêmes, ayant connu des événements coronariens, ce qui pourrait ne pas refléter ce qui se passe dans la population générale. Enfin, beaucoup de SNP se localisent dans des régions intergéniques ce qui complique la tâche pour comprendre leur rôle exact : sont-ils directement impliqués

dans la physiopathologie de la maladie ou ne sont-ils le reflet que d'autres mutations avec qui ils sont en déséquilibre de liaison ?

D) Limites, conclusion, perspectives et alternatives aux GWAS :

Afin de s'affranchir des variations possibles d'un phénotype intermédiaire tel que le bilan lipidique, le génotypage pourrait offrir la possibilité de stratifier les patients dès le plus jeune âge en l'absence de toute dyslipidémie. Malheureusement, les GWAS ont plus révolutionné la biologie que la pratique clinique quotidienne et l'avenir d'une thérapeutique personnalisée en fonction de son risque génétique n'est pas encore proche. Cependant, nous avons vu que l'établissement de cartes de risque génétique pourrait être bénéfique pour évaluer pronostic et/ou diagnostic. De plus, la combinaison de SNP à des indicateurs moins utilisés tels que les CNV pourrait être pertinente puisqu'une étude combinant SNP et CNV présents dans le gène codant le récepteur aux LDL a permis d'augmenter le diagnostic d'hypercholestérolémie familiale (J. Wang, Ban, & Hegele, 2005).

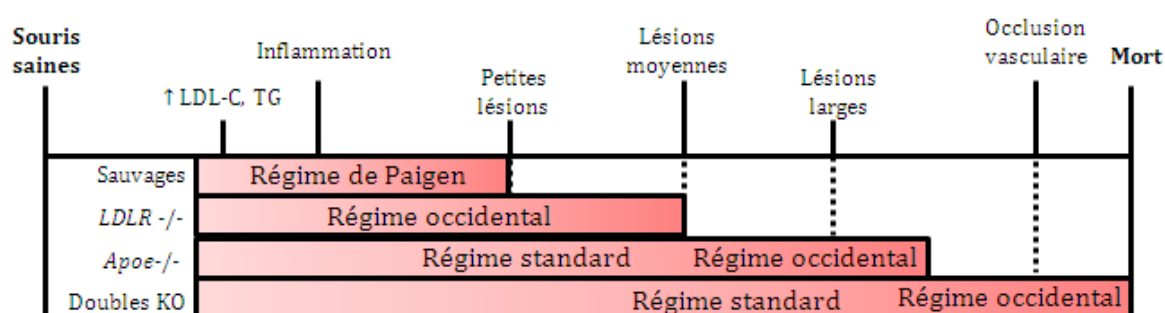
Afin de compléter les connaissances actuelles, de nouvelles perspectives post-GWAS semblent donc prometteuses :

- Identification de variants additionnels ayant des effets modérés voire faibles *via* la réalisation de méta-analyses à grande échelle.
- Identification des variants causaux.
- Explication des mécanismes sous-jacents à l'association de ces différents loci (environ trois-quarts des loci liés aux CAD sont nouveaux et n'ont jamais été suspectés d'être liés à l'athérosclérose ou l'IDM auparavant) (Stylianou, Bauer, Reilly, & Rader, 2012).

La découverte des miRNA et de leurs mécanismes d'action pourraient permettre d'avancer dans ce sens et de comprendre pourquoi certains SNP identifiés dans les GWAS sont associés aux pathologies cardio-vasculaires. Ils pourraient en effet être en déséquilibre de liaison avec des variants se situant dans les éléments de reconnaissance des miRNA (MRE) en 3'UTR. L'apparition d'un variant au niveau de ces MRE pourrait alors avoir des conséquences fonctionnelles *via* la création ou la disparition de ces sites de régulation

(Richardson, Lai, Parnell, Lee, & Ordovas, 2011). A côté de cela, des technologies encore plus récentes devront donc être mises en place telles que des séquençages à haut débit ou du séquençage d'exome qui permettront la détection de variants rares (moins de 0.01 de fréquence allélique). Un des principaux avantages du séquençage d'exome (c'est-à-dire de l'ensemble des 180000 exons du génome) permet un gain d'argent mais aussi de temps ainsi qu'une interprétation plus aisée puisqu'on sait aujourd'hui que plus des deux-tiers des maladies associées à un gène se situent dans les exons (A J. Marian & Belmont, 2011). Ces nouvelles techniques de séquençage permettent en plus d'analyser les modifications épigénétiques (Methyl-Seq) ou les sites de liaison des facteurs de transcription (séquençage d'ADN chromatinien immuno-précipité ou ChIP Seq qui analyse les interactions ADN/protéine). Concernant la compréhension des mécanismes potentiels, en plus de l'approche *in silico*, l'utilisation de modèles murins pourrait s'avérer d'un grand secours. En effet, l'utilisation de différents modèles murins a déjà permis de faire un lien entre plus de 100 gènes et le processus athéromateux (Stylianou *et al*, 2012). Ce processus qui est fortement similaire entre la souris et l'homme (figure 33) ne doit toutefois pas en faire oublier les conséquences qui sont différentes entre les deux espèces (carotides, coronaires et vaisseaux cérébraux touchés pour l'homme, aorte et grands vaisseaux proximaux chez la souris) ni la différence de certains traits métaboliques intermédiaires comme le profil lipoprotéique (prédominance de LDL pour l'homme, HDL pour la souris).

A- Phénotypes des différents modèles de souris lors du processus athéromateux



B- Progression de l'athérosclérose chez l'homme

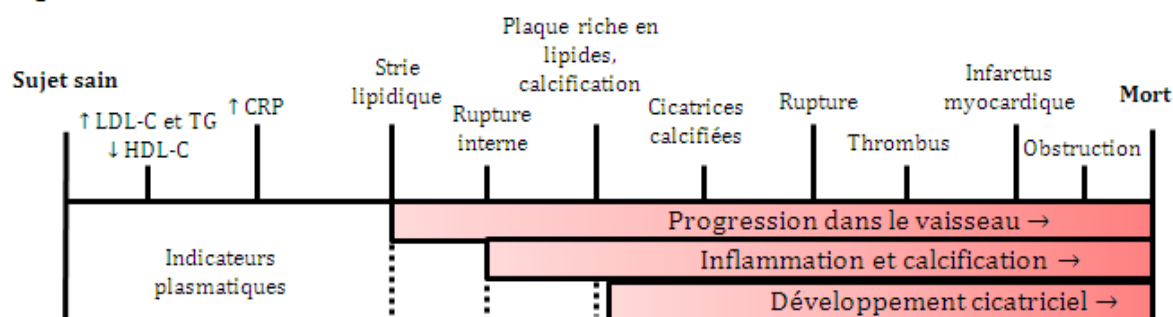


Figure 33 : Progression de l'athérosclérose chez la **souris (A)** et l'**homme (B)**. **A :** Les souris sauvages sous régime standard ne sont pas sujettes à athérosclérose d'où le développement de régimes appropriés et de souches de souris particulièrement susceptibles à l'athérosclérose. Régime de Paigen : régime riche en cholestérol (1.25%), cholate (0.5%) et graisses (15%). Régime occidental : régime riche en cholestérol. Régime standard : régime pauvre en cholestérol (<0.04%). **B :** caractérisation clinique de l'athérosclérose chez l'homme. D'après (Stylianou *et al*, 2012).

Ainsi, bien que s'agissant d'un modèle de choix en raison de sa petite taille, de sa facilité de manipulation et du haut degré de similarité avec le génome humain, 34% de génome identique entre les deux espèces (Center for biomolecular science & Engineering, n.d.) avec 85% de gènes identiques (Human Genome Project Information, n.d.)(Human Genome Project Information, n.d.), il s'agit d'être attentif aux mécanismes de régulation qui sont potentiellement différents en particulier au niveau des régions non codantes qui pourraient ne pas être conservées.

Enfin, il ne faut pas oublier que prédire l'évolution précise des maladies cardiovasculaires est quelque peu audacieux en raison des multiples facteurs qui interviennent dans leur genèse (environnement, nutrition, interaction gène-environnement...). C'est d'ailleurs pour cela que les études de pharmacogénétique et de nutriginétique pourraient prendre de plus en plus d'importance à l'avenir et que les interactions existant entre tous les

membres de ces réseaux devront être connues afin de pouvoir réaliser de façon efficace une prédiction génétique de ces risques.

À côté de cela, il faudra bien entendu améliorer la compréhension du métabolisme lipidique et notamment celui des HDL ; un approfondissement des connaissances sur les miRNAs s'inscrit dans cette logique. Par exemple, la découverte des miR33 apporte de nouvelles perspectives, auparavant insoupçonnées, sur les mécanismes de régulation géniques. Alors que la plupart des miRNA sont localisés dans des régions intergéniques, miR-33a et miR-33b sont localisés dans les séquences introniques des facteurs de transcription SREBP2 et SREBP1. Ils sont co-transcrits en même temps que ces gènes et répriment les gènes qui s'opposent aux fonctions des SREBP, c'est-à-dire les gènes impliqués dans l'efflux de cholestérol (*ABCA1*, *ABCG1* et *NPC*) et l'oxydation des acides gras (*HADHB*, *CPT1A*, *CROT*) (Ouimet & Moore, 2013). Au-delà de la génétique classique, l'exploration de ces miRNA pourrait donc permettre de mieux appréhender le métabolisme lipidique, certains voyants en eux une nouvelle classe de biomarqueurs sanguins pouvant être utiles pour la détection et le suivi des pathologies cardio-vasculaires (Xu *et al*, 2012).

CHAPITRE IV :

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

A) Relation entre mutation du gène codant la lipase hépatique et la maladie coronarienne :

a. Introduction :

Depuis trois décennies l'influence de la LH sur le métabolisme du HDL a fait l'objet de nombreuses recherches. Pour rappel, cette enzyme possède comme substrats les phospholipides et les triglycérides des HDL, mais elle agit également sur les IDL et les remnants de chylomicrons. Alors que l'invalidation du gène *LIPC* chez des souris est associée à une augmentation de la concentration de HDL enrichies en phospholipides et triglycérides (Brown *et al*, 2010), sa surexpression est accompagnée d'une forte diminution des taux de HDL-C (Jin, Marchadier, & Rader, 2002). Bien que son activité catalytique joue un rôle important, la surexpression d'une lipase hépatique catalytiquement inactive chez des souris invalidées pour *LIPC* engendre également une diminution des taux de HDL même si elle est moins importante que celle obtenue avec de la LH sauvage (Jin *et al*, 2002). L'influence de cette enzyme sur la modulation des taux de HDL-C pourrait s'expliquer par son action lors de la captation hépatique des HDL qui est la dernière étape du transport retour du cholestérol. En effet, *in vitro*, son expression conjointe avec celle de la CETP est associée à une augmentation de la captation du cholestérol ester des HDL par SR-BI (Collet *et al*, 1999). Ce rôle facilitateur de la dernière étape du métabolisme du cholestérol HDL (figure 34 ci-après) semble donc d'une part être lié à son action de pontage avec les héparans sulfates à la surface des hépatocytes mais aussi à son activité phospholipasique A1. Des études *in vivo* de perfusion de foie de rat ont en effet montré que l'absence de LH est associée à une diminution de la captation hépatique du cholestérol ester quand les HDL sont constituées de diacyl-glycérol-phospholipides, substrats de la LH, mais que cela n'avait aucun impact quand les HDL sont constituées d'alkyl-acyl-phospholipides (analogues non hydrolysables) (Marques-Vidal *et al*, 1994). Peu après cela, notre laboratoire a mis en évidence que la LH, en agissant sur des HDL-2 riches en triglycérides, génère une pré β 1-HDL et un remnant de HDL-2 ayant une apoA-I de conformation différente ainsi qu'un environnement lipidique modifié (K Guendouzi *et al*, 1999). De façon intéressante, ces remnants de HDL-2 sont plus rapidement éliminés par le foie. Il a alors été montré sur des cellules HepG2 en culture que les particules HDL-2 riches en triglycérides ne se liaient qu'à des sites de basse affinité alors

que les remnants de HDL-2 étaient en plus capables de se lier à un site de haute affinité. Ces remnants étant alors internalisés plus rapidement et en plus grande quantité que les HDL-2 natives (K Guendouzi *et al*, 1999).

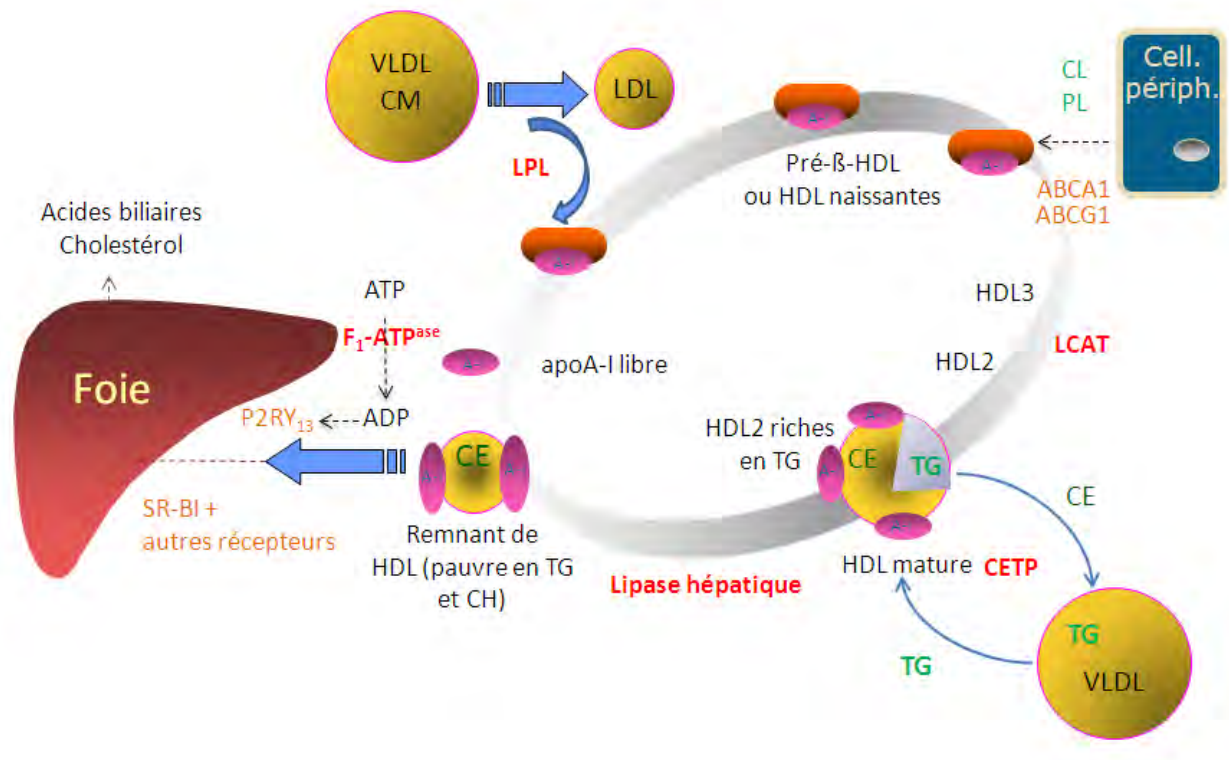


Figure 34 : Schéma général du métabolisme des HDL. La lipase hépatique de part sa position dans le transport retour du cholestérol est un acteur crucial de la captation des HDL par le foie. D'après (Perret *et al.*, 2007).

Concernant le rôle de la LH dans le développement de l'athérosclérose chez l'homme, nous avons vu dans la partie bibliographique qu'un polymorphisme du promoteur du gène *LIPC* (rs1800588) est particulièrement fréquent et qu'il est associé à une diminution de l'activité de l'enzyme ainsi qu'à une augmentation des taux de HDL-C (Isaacs *et al*, 2004; Zambon *et al*, 1998). Cependant, les données de la littérature ne sont pas concluantes sur l'association entre ce polymorphisme et le risque coronarien (Andersen *et al*, 2003; Dugi *et al*, 2001; Fan *et al*, 2009; Soyal *et al*, 2011).

Notre laboratoire a de tout temps orienté sa recherche vers une meilleure compréhension du métabolisme du HDL. Dans ce cadre, un axe de recherche préférentiel a été la captation hépatique du cholestérol HDL qui est l'une des dernières étapes du transport retour du cholestérol. Ayant préalablement mis en évidence l'importance de la LH

dans l'accélération du catabolisme des HDL-2 (Collet *et al*, 1999; Karim Guendouzi, Collet, Perret, Chap, & Barbaras, 1998), il nous a paru intéressant d'évaluer si la principale mutation de *LIPC*, qui est sujette à controverse, est associée à différents marqueurs cliniques ou biologiques du risque cardio-vasculaire, dans une de nos études cliniques chez l'homme. Nous collaborons en effet depuis quelques années avec les services d'épidémiologie et de cardiologie du centre Hospitalo-Universitaire de Toulouse qui ont notamment mis en place une étude cas-témoins incluant environ 800 sujets pour chaque groupe, l'étude GENES (Génétique et ENvironnement en Europe du Sud). Les cas sont des hommes âgés de 45 à 74 ans vivant dans la région toulousaine et souffrant de maladie coronarienne stabilisée. Chacun d'eux a été examiné dans le service de cardiologie et a subi une angiographie coronaire. Les contrôles sont également des hommes qui leur sont appariés en âge et qui ont été examinés dans des centres de médecine préventive ou en médecine du travail. L'examen médical a consisté en un interrogatoire standardisé par un médecin expérimenté puis au renseignement de différents questionnaires portant sur des variables socio-économiques, le niveau d'éducation, le statut tabagique, la consommation d'alcool, l'activité physique, ou bien encore, les antécédents médicaux personnels et familiaux. L'examen physique a consisté en des mesures cliniques et anthropométriques telles que le tour de taille, l'évaluation de l'IMC, la mesure de la tension artérielle ou de la fréquence cardiaque. Cette étude, bien que de petite taille, présente donc l'avantage de fournir des données très précises que ce soit sur le plan clinique (index bras-cheville, indices de sévérité et d'extension de la maladie), nutritionnel, de l'imagerie (angiographie) ou de la biologie (bilans lipidiques complets, dosages d'insuline, d'adiponectine...).

Mon travail a consisté en la rédaction du manuscrit ainsi qu'à la confirmation des résultats de génotypage par une autre méthode, la technologie Fluidigm® (chapitre discussion et perspectives).

b. Article 1 :

Association of Hepatic Lipase -514T Allele with Coronary Artery Disease and Ankle-Brachial Index, Dependence on the Lipoprotein Phenotype: The GENES Study

Céline Verdier^{1,2}, Jean-Bernard Ruidavets^{3,4}, Vanina Bongard^{3,4}, Dorota Taraszkiwicz⁵, Laurent O. Martinez², Meyer Elbaz^{2,5}, Jean Ferrières^{4,5}, Bertrand Perret^{1,2*}

1 CHU Toulouse, Department of Biochemistry, Toulouse, France, **2** INSERM UMR 1048, Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires de Toulouse, Université de Toulouse III, Toulouse, France, **3** CHU Toulouse, Department of Epidemiology, Toulouse, France, **4** INSERM UMR 1027, –Epidémiologie et Analyses en Santé publique, Université de Toulouse III, Toulouse, France,, **5** CHU Toulouse, Department of Cardiology, Toulouse, France

Abstract

Objectives: Relationship between hepatic lipase (*LIPC*) polymorphism and coronary artery disease (CAD) has often led to contradictory results. We studied this relation by genotyping rs1800588 in the *LIPC* promoter in a case-control study on CAD (the GENES study). We also investigated the relationship between this polymorphism and the ankle-brachial index (ABI), which is predictive of atherosclerosis progression and complications in patients at high cardiovascular risk.

Methods: 557 men aged 45–74 with stable coronary artery disease and 560 paired controls were genotyped for rs1800588. Medical data, clinical examination including determination of ABI and biological measurements related to cardiovascular risk factors enabled multivariate analyses and multiple adjustments.

Results: CAD cases showed a higher T-allele frequency than controls (0.246 vs 0.192, $p=0.003$). An interaction has been found between *LIPC* polymorphism and triglycerides (TG) levels regarding risk of CAD: TT-homozygosity was associated with an Odds ratio (OR) of 6.4 (CI: 1.8–22.3) when TG were below 1.5 g/L, but no association was found at higher TG levels (OR = 1.34, CI: 0.3–5.9). The distribution of *LIPC* genotypes was compared between CAD patients with normal or abnormal ABI and impact of *LIPC* polymorphism on ABI was determined. Following multiple adjustments, association of the T-allele with pejorative ABI (<0.90) was significant for heterozygotes and for all T-carriers (OR = 1.55, CI: 1.07–2.25).

Conclusion: The -514T *LIPC* allele is associated with CAD under normotriglyceridemic conditions and constitutes an independent determinant of pejorative ABI in coronary patients.

Citation: Verdier C, Ruidavets J-B, Bongard V, Taraszkiwicz D, Martinez LO, et al. (2013) Association of Hepatic Lipase -514T Allele with Coronary Artery Disease and Ankle-Brachial Index, Dependence on the Lipoprotein Phenotype: The GENES Study. PLoS ONE 8(7): e67805. doi:10.1371/journal.pone.0067805

Editor: Michael Müller, Wageningen University, The Netherlands

Received: January 20, 2013; **Accepted:** May 27, 2013; **Published:** July 9, 2013

Copyright: © 2013 Verdier et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study was realized with the financial support of INSERM (French National Institute of Health and Medical Research) and of the Toulouse University Hospital. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: perret.b@chu-toulouse.fr

Introduction

HDL-cholesterol (HDL-C) is established as inversely related to cardiovascular risk. Among candidate genes, *LIPC* is one displaying the strongest impact on HDL-cholesterol (HDL-C) concentrations [1,2] and would account for over 50% of HDL-C genetic variability in humans [3]. Most of it depends on a common polymorphism of the *LIPC* promoter, of which the C-514T is a signature. Variant allele confers a decreased expression and activity of LIPC [4]. Its impact on atherogenesis is still a matter of debate [5]: a pro-atherogenic role of LIPC is hypothesized in light of its functions in the catabolism of HDL and in the formation of small and dense LDL. Conversely, other functions of LIPC might be anti-atherogenic, like its effects on HDL liver uptake, the last step of reverse cholesterol transport, and its ability to complete the lipolysis of TG-rich lipoproteins [6]. Impact of *LIPC* variation on clinical atherosclerosis is also controversial [7–10]. Recent reviews

suggest that the impact of *LIPC* on CAD would be dependent on the underlying lipoprotein phenotype [5,11]. Low HDL is a frequent abnormality among CAD patients [12], often associated with hypertriglyceridemia as components of metabolic syndrome occurring in a climate of insulin resistance. In the present study, we have re-evaluated the relationship between *LIPC* polymorphism and the atherosclerotic disease, comparing stable CAD-patients to paired control subjects taken from the general population. We have also considered the ankle-brachial index (ABI), a clinical non-invasive index reflecting the progression of the atherosclerotic disease in CAD patients. Indeed, ABI has been considered as a prognosis marker of further complications in patients at high cardiovascular risk [13,14]. In this respect, a recent study from our group has shown that abnormal ABI is predictive of mortality among CAD patients [15]. Our present observations support a deleterious impact of the *LIPC* -514T

variant on this index of atherosclerosis progression in CAD patients.

Methods

Study Population

The “Génétique et Environnement en Europe du Sud” (GENES) study is a case-control study designed to assess the role of genetic, biological and environmental determinants in the occurrence of CAD. As previously described [15], cases were stable male CAD patients living in the Toulouse area (South-western France), aged between 45 and 74 and recruited from 2001 to 2004 after admission in the department of cardiology of the Toulouse University Hospital. They were admitted for cardiovascular examination, in the context of evaluation and management of their CAD. Stable CAD was defined by a previous history of acute coronary syndrome, a previous history of coronary artery revascularization, a documented myocardial ischemia, a stable angina, or the presence at the coronary angiography of a coronary stenosis $\geq 50\%$. Patients who had presented a recent acute coronary episode were considered as not stable and were not included in the study. During the same period, male controls, aged 45–74 years, were selected from the general population using electoral rolls. Stratification by 10-age group was employed to approximately match the age distribution between controls and cases. Information was provided about the objectives of the study, and informed consent was signed. Controls and cases underwent medical examination in the same health centre and during the same period, including clinical and anthropometric measurements and completion of a questionnaire. Blood samples were taken. In the present analysis, we took into account approximately the first 600 patients and 600 control subjects, in whom genotyping for *LIPC* genes was performed. The whole study protocol has been conducted according to the principles of the Declaration of Helsinki. The protocol was endorsed by the Scientific Council of the Toulouse University Hospital. It was approved by the “Comité Consultatif pour la Protection des Personnes se prêtant à la Recherche Biomédicale” (Advisory Committee regarding protection of persons involved in medical investigation, Comité Toulouse/Sud-Ouest #1) file number 1-99-48. The biological sample collection was declared to the French Ministry of Research and to the Regional Health Agency under number DC-2008-403 #1. Information was provided about the objectives of the study, and informed consent was signed.

Data Collection

Age, socioeconomic variables and information on cardiovascular risk factors were collected through standardized face-to-face interviews, performed by a single physician. Smoking status was classified as current smokers, former smokers having quit tobacco for more than 3 months and non-smokers. Alcohol consumption was assessed using a typical week pattern. The total amount of alcohol consumed was calculated as the sum of different types of drinks allowing categorization into three levels: abstainers, moderate alcohol consumption (1–39 g/day) and heavy consumption ≥ 40 g/day. Physical activity was investigated through a standardized questionnaire and categorized into two levels: no or moderate physical activity during 20 min less than once a week, and intense physical activity ≥ 20 min each session \geq twice a week. Presence of dyslipidemia, diabetes or hypertension was assessed from the subjects' current treatments. In patients, medications at discharge were also considered. Anthropometrical measurements included waist circumference, height, body weight and body mass index (BMI) was calculated (kg/m^2). Blood

pressure and resting heart rate were measured after ≥ 5 min rest with an automatic sphygmomanometer. Two measurements were performed and average values were recorded. Metabolic syndrome was defined according to the NCEP-ATPIII [16] and insulin resistance was estimated by the Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance (HOMA-IR). ABI was evaluated as previously described [15]. The lower limb blood pressure was determined from the right and left posterior tibial arteries with the patient in supine position. When the posterior tibial artery blood pressure was not measurable, the *dorsalis pedis* artery was used. The systolic blood pressure was detected with a hand-held Doppler probe. ABI was calculated for each lower limb by dividing the ankle systolic blood pressure by the average of the two measurements performed on the arm. For each patient, the lowest ABI recorded in the 2 ankles was kept for further analysis. An ABI < 0.9 was considered abnormal.

Biological Measurements

Blood was collected after an overnight fast. Glycaemia, triglycerides, total cholesterol and HDL-cholesterol were assayed with enzymatic reagents on an automated analyser (Hitachi 912, Roche diagnostics). LDL-cholesterol was calculated using the Friedwald formula. CRP and Gamma-GT were also analysed with an automated analyser (Hitachi, Roche-Diagnostics). Insulin measurements were done using an immunometric assay (Advia Centaur, Siemens); adiponectin was measured by an ELISA technique (R&D systems). ApoA-I, apo-B and lipoprotein (Lp) (a) were determined by first order precipitation in an automated analyser (Hitachi, Roche-Diagnostics). Total apoE and apoC-III were measured by electro-immunoassay (Sebia, France). LpA-I was also determined by electro-immunoassay (Sebia).

Genetic Polymorphism

Genomic DNA was isolated from EDTA-treated blood, using silica columns (Macherey-Nagel). Genotyping at position -514 of the *LIPC* gene (rs1800588) was performed with polymerase chain reaction (PCR) amplification. DNA was amplified using primers 5'-AAG AAG TGT GTT TAC TCT AGG ATC A-3' (sense) and 5'-GGT GGC TTC CAC GTG GCT GCC TAA G-3' (anti-sense) with an annealing temperature of 58°C. The C-514T substitution introduces a *NlaIII* endonuclease restriction site. PCR products were incubated for 16h with *NlaIII* (New England Biolabs). Restriction fragments were separated by electrophoresis on an ethidium bromide-pre-stained 2% Agarose gel. The wild-type PCR product does not contain a *NlaIII* restriction site and yields a 299 bp band. Heterozygotes display bands of 299, 215 and 84 bp whereas homozygotes show bands of 215 and 84 bp.

Statistical Analyses

In descriptive tables, data are presented as percentages and numbers for qualitative variables, and as means with standard deviations for quantitative ones. The Chi-squared test was used to compare the distribution of qualitative variables between CAD cases and controls and, among CAD patients, between subjects with ABI < 0.9 and with ABI ≥ 0.9 . The mean values of quantitative variables were compared by Student's *t*-test. Shapiro-Wilks was used to test the normality of distribution of residuals and Levene's test to test the homogeneity of variances. When basic assumptions of Student's *t*-test were not satisfied, data were logarithmically transformed or subjected to a Wilcoxon-Mann-Whitney test. Two-way analysis of variance was used to test the association of lipids, lipoproteins and biological markers of glucose regulation with the CAD status and *LIPC* genotypes.

Interactions between the case-control design, *LIPC* genotypes and all the studied variables were verified.

Multivariate stepwise logistic regression analysis was used to determine independent associations between the CAD status and key exposures (*LIPC*), adjusting for covariates at various levels. The model was built using stepwise regression of the candidate variables with p values ≤ 0.10 to enter the model and ≤ 0.05 to be maintained. In addition, the multivariate model was adjusted for diabetes, hypertension, dyslipidemia, smoking, alcohol consumption, physical activity, CRP, HDLc, Lp(a) and triglycerides. A further adjustment on ABI was done. Because a significant interaction of *LIPC* with triglycerides was found ($p < 0.10$), a stratification analysis was carried out according to different cut-offs of plasma TG. Data are illustrated for the cut-off between the 2nd and 3rd tertiles (1.5 g/L), corresponding to the limit between normo- and hyper-triglyceridemic subjects. Similarly, to determine independent associations between ABI status and *LIPC*, multivariate stepwise logistic regression analysis was performed adjusting for various covariates. The multivariate model was adjusted for diabetes, smoking, physical activity and heart rate.

The performance of final models was evaluated by analysis of the area under the receiver operating characteristic (ROC) curve (AUC). The internal validity of the prediction models was evaluated by bootstrapping [17,18], using 100 random resamplings of equal size from the complete data set. Performances (AUC) in the bootstrap samples and in the original sample are given in legends to tables.

Analyses were two-tailed and $p < 0.05$ was considered to be significant. The false discovery rate (FDR) method was used to correct for multiple comparisons in subgroup analyses (according to ABI values). Statistical interactions were tested and considered as significant at $p \leq 0.20$. Computation was carried out with SAS software, version 9.2 (SAS Institute, Cary, IL, USA).

Results

Characteristics of Cases and Controls

In the GENES study, genotyping of different loci affecting metabolism of plasma lipoproteins was carried out among 600 pairs of CAD patients and control subjects. Regarding *LIPC* variants, complete data were available for 560 controls and 557 cases (Table 1). Treatments for major cardiovascular risk factors, including diabetes, dyslipidemia, hypertension, and smoking habits were much more frequent in cases than in controls. Conversely, physical activity was less frequent in cases. Cases displayed characteristics of metabolic syndrome, with elevated glycaemia and triglycerides and low HDL concentrations. Levels of pro-atherogenic apo CIII- and apo E-containing particles derived from the metabolism TG-rich lipoproteins, were increased in CAD cases. Signs of insulin resistance were also evident in cases, such as elevated waist circumference, high insulin levels and HOMA index. Also, adiponectin, an insulin sensitizing adipokine, was significantly lower in cases than in controls. Concordantly, prevalence of metabolic syndrome according to the NCEP-ATPIII definition was 50% among cases, compared to 17% in controls. Cases displayed rather low levels of cholesterol and apo B, and blood pressure figures were comparable with those in controls, which might reflect the effectiveness of administered treatments. Frequencies of subjects with elevated levels of CRP (≥ 3 mg/L), Lp(a) (≥ 0.25 g/L) and GGT (≥ 36 IU/L) were much higher in CAD cases than in controls. Finally, a pejorative value of ABI (< 0.9) was evident in 32.5% of CAD patients and in only 1.6% of controls. Distribution of *LIPC* genotypes was significantly different between controls and cases (Table 1). The calculated T-allele

Table 1. Characteristics according to case-control design.

	Cases n = 557	Controls n = 560	p
<i>LIPC</i>			0.001
CC	57.8% (322)	63.6% (356)	
CT	35.2% (196)	34.3% (192)	
TT	7.0% (39)	2.1% (12)	
Age (years)	60.3 (8.1)	58.7 (8.3)	0.002
BMI (kg/m ²)	27.3 (4.0)	26.8 (3.4)	0.05**
Waist circumference (cm)	99.0 (10.7)	94.8 (9.6)	0.001
Systolic blood pressure (mmHg)	138 (20)	137 (15)	0.14**
Heart rate (beats/mn)	63.9 (12.2)	63.3 (9.2)	0.31**
Glycaemia (g/L)	1.10 (0.39)	0.98 (0.18)	0.003**
Insulin (IU/L)	16.1 (23.8)	9.9 (7.2)	0.001*
HOMA-IR	4.7 (10.2)	2.5 (2.3)	0.001*
Adiponectin (mg/L)	5.8 (4.5)	7.0 (4.6)	0.001
TC (g/L)	2.02 (0.42)	2.25 (0.38)	0.001
HDLc (g/L)	0.43 (0.12)	0.56 (0.13)	0.001
LDLc (g/L)	1.26 (0.37)	1.46 (0.33)	0.001
Apo A-1 (g/L)	1.23 (0.23)	1.52 (0.24)	0.001
Apo B (g/L)	1.05 (0.24)	1.10 (0.22)	0.001
TG (g/L)	1.68 (0.94)	1.19 (0.78)	0.001*
Apo C3 (g/L)	33.5 (13.8)	30.8 (13.0)	0.001
Apo E (g/L)	102.8 (61.0)	74.7 (47.2)	0.001*
LpA1 (g/L)	0.46 (0.14)	0.56 (0.18)	0.001*
Lp(a) ≥ 0.25 g/L (median)	61.0% (340)	40.2% (225)	0.001
CRP ≥ 3 mg/L (median)	75.4% (420)	31.3% (175)	0.001
GGT ≥ 36 IU/L (median)	58.2% (324)	44.1% (247)	0.001
Metabolic syndrome (NCEP-ATPIII)	50.4% (278)	16.8% (94)	0.001
Diabetes	24.1% (134)	4.6% (26)	0.001
Dyslipidemia	60.7% (338)	23.4% (131)	0.001
Hypertension	44.7% (249)	18.7% (105)	0.001
Former and current smokers	81.0% (452)	65.0% (364)	0.001
Alcohol (1–39 g/day)	53.9% (300)	66.1% (370)	0.001
Intense physical activity	11.5% (64)	38.7% (217)	0.001
Ankle-brachial index < 0.9	32.5% (181)	1.6% (9)	0.001

Mean (standard deviation) or % (n).

*Analyses were performed on log transformed data.

**Kruskal-Wallis test.

doi:10.1371/journal.pone.0067805.t001

frequency was 0.192 in controls *versus* 0.246 in CAD cases ($p = 0.003$, not shown). Both population samples did not diverge from the Hardy-Weinberg equilibrium ($p = 0.88$).

Metabolic Characteristics According to *LIPC* Genotypes

Table 2 shows distribution of *LIPC* genotypes in control subjects and CAD cases and their association with various metabolic markers. Homozygotes for the T-allele of *LIPC* promoter were 3-fold more numerous among cases than in controls (39 versus 12). The *LIPC* T-allele was associated with increased levels of cholesterol and apo B, of TG and apo C-III, with an allele-dose effect for the latter. TT-homozygotes also displayed elevated apo A-I ($p = 0.07$), reaching significance in the control subpopulation

Table 2. Lipids, lipoproteins and metabolic markers according to *LIPC* genotypes and case-control design.

	Cases			Controls			p value for case-control effect	p value for <i>LIPC</i> effect
	CC	CT	TT	CC	CT	TT		
Numbers of subjects	322	196	39	356	192	12		
TC (g/L)	1.99 (0.43)	2.05 (0.38)	2.08 (0.52)	2.22 (0.35)	2.29 (0.41)	2.35 (0.51)	0.001	0.03
HDLc (g/L)	0.43 (0.12)	0.43 (0.14)	0.44 (0.10)	0.55 (0.12)	0.56 (0.14)	0.62 (0.12)	0.001	0.31
LDLc (g/L)	1.25 (0.37)	1.27 (0.34)	1.31 (0.48)	1.45 (0.32)	1.47 (0.35)	1.49 (0.42)	0.001	0.40
TG (g/L)*	1.62 (0.96)	1.77 (0.91)	1.73 (0.91)	1.13 (0.61)	1.30 (1.02)	1.33 (0.74)	0.001	0.02
Apo A-1 (g/L)	1.22 (0.21)	1.23 (0.25)	1.27 (0.18)	1.51 (0.23)	1.52 (0.25)	1.68 (0.21)	0.001	0.07
Apo B (g/L)	1.04 (0.23)	1.07 (0.22)	1.10 (0.32)	1.09 (0.21)	1.13 (0.22)	1.13 (0.28)	0.001	0.04
Apo E (g/L)*	99.6 (59.3)	108.5 (61.4)	100.7 (71.9)	72.3 (42.3)	79.7 (55.2)	67.1 (43.8)	0.001	0.12
Apo C3 (g/L)*	32.3 (12.5)	34.3 (12.8)	39.6 (23.5)	30.2 (11.9)	31.5 (14.7)	35.8 (16.8)	0.001	0.009
Glycaemia (g/L)*	1.11 (0.41)	1.06 (0.35)	1.10 (0.45)	0.97 (0.17)	0.99 (0.20)	1.00 (0.19)	0.001	0.86
Insulin (IU/L)*	16.1 (21.3)	14.9 (23.6)	23.1 (38.5)	9.5 (6.8)	10.5 (7.8)	10.8 (6.9)	0.001	0.37
HOMA-IR*	4.9 (11.8)	4.1 (6.5)	6.5 (10.9)	2.4 (2.1)	2.7 (2.7)	2.8 (2.3)	0.001	0.45
Adiponectin (mg/L)	5.8 (4.2)	6.0 (5.1)	6.0 (4.6)	7.2 (4.9)	6.6 (3.9)	4.8 (3.3)	0.001	0.62
Metabolic syndrome (NCEP-ATPIII)	52.8%	46.9%	48.7%	16.3%	17.7%	16.6%	0.001	0.72

*Analyses were performed on log transformed data.

doi:10.1371/journal.pone.0067805.t002

($p=0.04$, not shown). No significant association was found between *LIPC* genotype and markers of insulin resistance, occurrence of metabolic syndrome (Table 2) or with anthropometric variables (not shown).

Association of *LIPC* Polymorphism with the Status of CAD Case

Considering the T-allele higher prevalence in CAD cases than in controls, we investigated the impact of *LIPC* polymorphism on the risk to be a case (Table 3). In univariate analysis, TT-homozygotes presented an OR of 3.62 (CI: 1.87–7.06) of being a CAD-case, while OR for CT-heterozygotes was non-significant. Then, multivariate analyses were performed taking into account major cardiovascular risk factors and parameters having proved to be different between cases and controls. Even after multiple adjustments on those established factors or markers, TT-homozygosity conferred an increased risk of ischemic heart disease (OR = 3.41, CI: 1.22–9.59). Interestingly, a statistic interaction was evidenced between *LIPC* polymorphism and TG levels regarding the risk of CAD ($\text{Chi}^2=4.61$, $p=0.10$). Thus impact of *LIPC* polymorphism was studied at different cut-offs of triglyceride distribution in the whole population. Table 3 illustrates association of *LIPC* genotype to CAD from both sides of the 2nd–3rd tertiles cut-off, at 1.5 g/L, corresponding to the upper limit of normal values. In normotriglyceridemic subjects, TT-homozygosity was strongly associated to CAD, with an OR of 6.4 (CI: 1.8–22.3). This association was no longer observed in hypertriglyceridemic conditions (≥ 1.5 g/L): OR was 1.34, (CI: 0.3–5.9). The analysis was resumed using different cut-offs for plasma triglycerides, (the 50th and 75th percentiles, corresponding to 1.22 and 1.75 g/L) leading to similar observations: significant association of -514T homozygosity to CAD at low triglyceridemias and no more association at highest TG levels.

Association of *LIPC* Polymorphism with a Pejorative ABI in CAD-cases

Because a high proportion (32.5%) of CAD-cases displayed a pejorative ABI (<0.9), the characteristics of those patients were compared with those cases having ABI above 0.9 (Table 4). Among the major cardiovascular risk factors, smoking habits, lack of physical activity, presence of diabetes, increased systolic blood pressure and heart rate were strongly associated with low ABI. None of the investigated metabolic parameters was significantly different according to ABI, except for a trend to higher adiponectin in patients with a pejorative index ($p=0.07$). The distribution of *LIPC* genotypes was compared between patients with normal or abnormal ABI. Clearly, T-carriers were much more frequent among patients with low ABI, with an allele frequency of 0.30 as compared to 0.22 in patients with normal ABI ($p=0.03$, not shown). Impact of *LIPC* polymorphism on ABI was further determined (Table 5). Unadjusted analyses indicated that the OR for having a low index was 1.55 (CI: 1.08–2.22) for all T-carriers. Following multiple adjustments on cardiovascular risk factors and markers, association of the T-allele with a pejorative ABI remained significant for heterozygotes and for all T-carriers (OR = 1.55, CI: 1.07–2.25). Results for TT-homozygotes failed to be significant, possibly due to lack of statistical power.

Discussion

Epidemiological studies have demonstrated the negative association between HDL and cardiovascular diseases. However, relevance of HDL for risk assessment has been recently questioned, as several mechanisms leading to elevated HDL levels do not unequivocally lead to cardiovascular risk protection [10,11,19]. Herein, we have evaluated the impact of a common genetic variant of *LIPC* in a large case-control study on CAD. T-allele homozygotes were found at increased risk of CAD.

Table 3. Risk for CAD according to *LIPC* genotypes.

	TG* <i>LIPC</i> Interaction					TG <1.50 g/L			TG ≥1.50 g/L		
	OR	95% CI	p	CHI2	p	OR	95% CI	p	OR	95% CI	p
Unadjusted											
CT vs CC	1.12	0.87–1.44	0.36								
TT vs CC	3.62	1.87–7.06	0.001								
CT and TT vs CC	1.27	0.99–1.62	0.06								
Adjusted ¹											
				4.61	0.10						
CT vs CC	0.93	0.65–1.33	0.69			0.93	0.58–1.49	0.77	0.79	0.43–1.45	0.46
TT vs CC	3.41	1.22–9.59	0.02 ²			6.37	1.82–22.3	0.004 ³	1.34	0.30–5.93	0.70
CT and TT vs CC	1.04	0.73–1.47	0.84								

¹Adjusted for diabetes, hypertension, dyslipidemia, smoking, alcohol consumption, physical activity, CRP, HDLc, Lp(a), triglycerides and ABI.

²Area under the curve (AUC) for adjusted model: 0.91; corrected AUC after bootstrap validation: 0.90.

³Area under the curve (AUC) for adjusted model: 0.92; corrected AUC after bootstrap validation: 0.91.

doi:10.1371/journal.pone.0067805.t003

Moreover, among CAD patients, T-allele was associated with a pejorative value of the ABI, an indicator of infra clinical peripheral arterial disease and a prognosis marker in CAD patients.

Several studies have clearly demonstrated that the *LIPC* T-allele is associated to a lower hepatic lipase activity and a rise in HDL [4,20]. It has been suggested that 38% of HDL-C variability would be explained by genetic variance, of which *LIPC* would contribute for up to 53% [3]. Recently, this association between *LIPC* polymorphisms and HDL was further confirmed in large genome-wide association studies [21,22]. In the present study, association of the -514T allele with elevated apo A-I was observed in controls ($p=0.04$) but not among cases, probably because of other interfering factors, like hypertriglyceridemia or administered treatments.

During the last decade, several clinical studies have examined the relationship between *LIPC* variants (–250 or –514) and CAD, leading to conflicting results [7–10,23]. For instance, regarding preclinical atherosclerosis, the –514T allele has been recently found associated to increased carotid atherosclerosis, as documented by intima media thickness and plaques [8], whereas another study concluded to absence of relationship [7]. Regarding the risk of CAD, studies concluded to no impact of *LIPC* variability while others demonstrated a negative effect of the –514T variant on CAD [9,11]. Interestingly, in the large secondary prevention REGRESS study, it was demonstrated that patients having a combination of defective alleles for *CETP* and *LIPC*, displayed high HDL levels but also the highest progression of coronary atherosclerosis [11]. Conclusions from meta-analyses also diverge regarding association between *LIPC* –514T and CAD [10,19]. Of note, one recent and among the largest meta-analyses dealing with SNPs affecting HDL-cholesterol found an association of *LIPC* rs1800588 with myocardial infarction [19]. Among possible reasons for such discrepancies, might be evoked differences in the study populations or in the definition of control subjects.

The present investigation has, in its design, the limitations of a cross-sectional, case – control study. However, with a clear definition of CAD cases and paired controls taken from the general population, it shows that *LIPC* T-allele is associated to both the CAD status and to ABI, a marker of atherosclerosis progression. Recently, a large Mendelian randomisation study, cited above [19], clearly demonstrated that several genetic determinants that raise HDL-cholesterol, including the parent *LIPC* coding for endothelial lipase, do not lower the cardiovascular

risk. All those observations converge to suggest that genetic variations that increase HDL but impair their normal catabolism might be deleterious regarding atherosclerotic diseases.

In this study, a large proportion of patients (60%) were under cholesterol lowering therapy, explaining why LDL-cholesterol and apo B were lower in cases than in controls. However, all multivariate analyses were adjusted on lipid levels and treatment for dyslipidemia, and the –514T allele frequencies were identical when subjects under lipid lowering therapy were excluded (not shown). The cases' metabolic profile was quite evocative of metabolic syndrome, with low HDL, increased levels of TG-rich lipoproteins and moderate hyperglycaemia. Moreover, elevated insulin and HOMA index together with low adiponectin were signs of insulin resistance. Prevalence of metabolic syndrome according to NCEP-ATPIII was 50%, 3-times as much as in control subjects. Apo C-III is a major protein of VLDL, which accumulates in conditions of insulin-resistance. Increased levels of apo C-III and apo E reflects prolonged residence of TG-rich lipoproteins and their remnants, associated with abnormal persistence of circulating free fatty acids, which favour insulin resistance. Moreover, remnants derived from TG-rich lipoproteins are pro-atherogenic, and large prospective trials in CAD-patients have demonstrated that apo C-III-containing particles are the best predictors of lesion progression [24].

Several functions of *LIPC* argue in favour of its anti-atherogenic roles. *LIPC* acts on HDL phospholipids and TG prior to HDL uptake by liver. Thus, *LIPC* is a key partner in the final step of reverse cholesterol transport. Another impact of *LIPC* is the degradation of IDL and remnant particles derived from TG-rich lipoproteins, known to be highly atherogenic. On the other hand, a pro-atherogenic role of *LIPC* in dysmetabolic conditions has been postulated [20]. In hypertriglyceridemic and insulin resistant situations, with HDL and LDL enriched in triglycerides, *LIPC* would promote the formation of small and dense LDL and accelerate HDL catabolism [6,20]. Thus, it was suggested that the effects of *LIPC* on atherogenesis would depend on the underlying lipoprotein phenotype [5,20]. Our present observations firmly support this concept since the impact of *LIPC* variant on the CAD status was dependent on the plasma triglyceride concentration. Under normotriglyceridemic conditions (<1.5 g/L of plasma TG), the defective *LIPC* variant displayed a strong association with CAD, probably due to impaired reverse cholesterol transport. In hypertriglyceridemic conditions, association of *LIPC* variant to

Table 4. Characteristics according to ankle-brachial index status in CAD patients.

	<0.9	≥0.9	p
	181 (32.5)	376 (67.5)	
<i>LIPC</i>			0.03
CC	50.3% (91)	61.4% (231)	
CT	40.3% (73)	32.7% (123)	
TT	9.4% (17)	5.9% (22)	
Age (years)	60.9 (7.9)	60.0 (8.1)	0.19
TC (g/L)	2.05 (0.43)	2.01 (0.42)	0.32
HDLc (g/L)	0.44 (0.13)	0.43 (0.12)	0.27
LDLc (g/L)	1.28 (0.38)	1.25 (0.36)	0.35
TG (g/L)	1.69 (0.94)	1.67 (0.96)	0.80
ApoA1 (g/L)	1.23 (0.22)	1.23 (0.23)	0.84
ApoB (g/L)	1.07 (0.25)	1.05 (0.23)	0.32
Lp(a) (g/L)*	0.49 (0.49)	0.48 (0.44)	0.77
ApoE (mg/L)	99.7 (59.2)	104.2 (61.9)	0.41
ApoC3 (mg/L)	33.4 (13.4)	33.5 (13.9)	0.98
LpA1 (g/L)	0.46 (0.16)	0.45 (0.14)	0.36
CRP (mg/L)	16.6 (23.9)	13.7 (24.4)	0.20
GGT (IU/L)*	68.0 (74.6)	59.7 (59.2)	0.37
Glycaemia (g/L)	1.10 (0.43)	1.09 (0.38)	0.91
Insulin (IU/L)*	17.7 (26.3)	15.4 (22.4)	0.16
HOMA-IR*	5.6 (15.1)	4.3 (6.6)	0.29
Adiponectin (mg/L)	6.4 (4.8)	5.6 (4.4)	0.07
BMI (kg/m ²)	27.1 (3.9)	27.5 (4.0)	0.26
Waist circumference (cm)	98.9 (11.1)	99.1 (10.5)	0.87
Systolic blood pressure (mmHg)	140.7 (18.9)	136.6 (20.3)	0.03
Heart rate (beats/min)	66.0 (13.4)	64.0 (11.5)	0.007
Metabolic syndrome (NCEP-ATPIII)	48.6% (89)	50.9% (191)	0.75
Diabetes	30.4% (55)	21.0% (79)	0.02
Dyslipidemia	62.4% (113)	59.8% (225)	0.56
Hypertension	49.2% (89)	42.6% (160)	0.15
Never smoker	12.2% (22)	22.1% (83)	0.005
Alcohol (1–39 g/day)	50.3% (91)	44.2% (166)	0.18
Intense physical activity	7.2% (13)	13.6% (51)	0.03

*Log transformed data.

Mean (standard deviation) or % (n).

doi:10.1371/journal.pone.0067805.t004

CAD was lost. This suggests that defective *LIPC* would no longer be pro-atherogenic, as, on the opposite, it might counteract formation of small and dense LDL and slow down catabolism of apo A-I, helping to maintain HDL levels. Concordant with those observations, it was formerly reported that in dyslipidemic patients, *LIPC* polymorphisms would predict response to lipid lowering therapy in terms of atherosclerosis regression [25].

Lower limb arterial disease (LLA) is frequent among patients with multiple cardiovascular risk factors. ABI has emerged as a

Table 5. Risk for ankle-brachial index <0.90 according to *LIPC* genotypes in CAD patients.

	OR	95% CI	p ³
Unadjusted			
CT vs CC	1.50	1.03–2.19	0.03
TT vs CC	1.97	0.92–3.65	0.09
CT and TT vs CC	1.55	1.08–2.22	0.02
Adjusted ^{1–2}			
CT vs CC	1.52	1.03–2.25	0.036
TT vs CC	1.71	0.84–3.48	0.14
CT and TT vs CC	1.55	1.07–2.25	0.036

¹Adjusted for smoking, diabetes, physical activity and heart rate.All interactions between ankle-brachial index, *LIPC* genotypes and variables of adjustment were non-significant.²Area under the curve (AUC) for adjusted model: 0.73, corrected AUC after bootstrap validation: 0.72.³False discovery rate method was used to correct for multiple comparisons for subgroup analyses. Corrected p values are shown.

doi:10.1371/journal.pone.0067805.t005

non-invasive, easily implementable and reproducible tool to screen for the presence of LLA at a pre-clinical stage. A cut-off value of 0.9 could distinguish patients who need further exploration [26]. Herein, risk factors classically related to LLA (diabetes, smoking and increased blood pressure) were also those most strongly associated with low ABI. Moreover, in CAD-patients low ABI would be predictive of secondary events [13]. In the context of the GENES study follow-up, we recently demonstrated that ABI is an independent prognosis factor of all-cause mortality [15]. In the present paper, the *LIPC* T-allele appears as an independent determinant of a pejorative ABI in CAD-patients. The pro-atherogenic potential of the T-allele is reflected by its increased prevalence, from 0.19 in healthy controls to 0.22 in CAD-patients with ABI ≥0.9, and up to 0.30 in those having low ABI. A previous cross-sectional study on lower limb arterial disease has documented an impact of the –250A variant, which is in linkage disequilibrium with the –514T [27]. More recently, the same variant was found associated with ABI among diabetics [28]. The present study extends these observations to the most common –514 T in CAD-patients, in whom ABI was demonstrated to be a prognosis factor. Interestingly, while association to patent CAD was demonstrated only for T-allele homozygotes, association with pejorative ABI, a marker of infra-clinical disease progression, was evident for all T-carriers, confirming that T-allele carriage is indeed deleterious regarding atherosclerotic disease.

In conclusion, we have observed that the *LIPC*-T allele is independently associated with a clinical index of atherosclerosis progression, predictive of further complications among coronary patients.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: BP JBR JF ME. Performed the experiments: CV. Analyzed the data: JBR VB DT. Wrote the paper: CV BP LOM.

References

1. Teslovich TM, Musunuru K, Smith A, Edmondson AC, Stylianou IM, et al. (2010) Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids. *Nature* 466: 707–713.
2. Kathiresan S, Melander O, Guidicci C, Surti A, Burtt NP, et al. (2008) Six new loci associated with blood low-density lipoprotein cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol or triglycerides in humans. *Nat Genet* 40: 189–197.

3. Knoblauch H, Bauerfeind A, Toliat MR, Becker C, Luganskaja T, et al. (2004) Haplotypes and SNPs in 13 lipid-relevant genes explain most of the genetic variance in high-density lipoprotein and low-density lipoprotein cholesterol. *Hum Mol Genet* 13: 993–1004.
4. Isaacs A, Sayed-Tabatabael FA, Njajou OT, Witteman JCM, van Duijn CM (2004) The -514 C→T hepatic lipase promoter region polymorphism and plasma lipids: a meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 3858–3863.
5. Brunzell JD, Zambon A, Deeb SS (2012) The effect of hepatic lipase on coronary artery disease in humans is influenced by the underlying lipoprotein phenotype. *Biochim Biophys Acta* 1821: 365–372.
6. Jansen H, Verhoeven AJM, Sijbrands EJJ (2002) Hepatic lipase: a pro- or anti-atherogenic protein? *J Lipid res* 43: 1352–62.
7. Fan YM, Raitakari OT, Kähönen M, Hutri-Kähönen N, Juonala M, et al. (2009) Hepatic lipase promoter C-480T polymorphism is associated with serum lipids levels, but not subclinical atherosclerosis: The Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *Clin Genet* 76: 46–53.
8. Soyat SM, Sandhofer A, Hahne P, Oberkofler H, Felder T, et al. (2011) Cholesteryl ester transfer protein and hepatic lipase gene polymorphisms: effects on hepatic mRNA levels, plasma lipids and carotid atherosclerosis. *Atherosclerosis* 216: 374–380.
9. Andersen RV, Wittrup HH, Tybjaerg-Hansen A, Steffensen R, Schnohr P, et al. (2003) Hepatic lipase mutations, elevated high-density lipoprotein cholesterol, and increased risk of ischemic heart disease. *J Am Coll Cardiol* 41: 1972–1782.
10. Wang H, Jiang M, Qiu J (2010). Quantitative assessment of the effect of hepatic lipase gene polymorphism on the risk of coronary heart disease. *Arch Med Res* 41: 383–390.
11. van Acker BAC, Botma GJ, Zwinderman AH, Kuivenhoven JA, Dallinga-Thie GM, et al. (2008) High HDL cholesterol does not protect against coronary artery disease when associated with combined cholesteryl ester transfer protein and hepatic lipase gene variants. *Atherosclerosis* 200: 161–167.
12. Rubins HB, Robins SJ, Collins D, Iranmanesh A, Wilt TJ, et al. (1995) Distribution of lipids in 8,500 men with coronary artery disease. *Am J Cardiol* 75: 1196–1201.
13. Newman AB, Shemanski L, Manolio TA, Cushman M, Mittelmark M, et al. (1999) Ankle-arm index as a predictor of cardiovascular disease and mortality in the cardiovascular health study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19: 538–545.
14. Morillas P, Quiles J, Cordero A, Guindo J, Soria F, et al. (2009). Impact of clinical and subclinical peripheral arterial disease in mid-term prognosis of patients with acute coronary syndrome. *Am J Cardiol* 104: 1494–1498.
15. Bouisset F, Bongard V, Ruidavets JB, Hascoët S, Taraszkiewicz D, et al. (2012). Prognostic usefulness of clinical and subclinical peripheral arterial disease in men with stable coronary heart disease. *Am J Cardiol* 110: 197–202.
16. Bataille V, Perret B, Dallongeville J, Arveiler D, Yarnell J, et al. (2006) Metabolic syndrome and coronary heart disease risk in a population-based study of middle-aged men from France and Northern Ireland. A nested case-control study from the PRIME cohort. *Diabetes Metab* 32: 475–479.
17. Harrell FE Jr, Lee KL, Mark DB (1996). Multivariable prognostic models: issues in developing models, evaluating assumptions and adequacy, and measuring and reducing errors. *Stat Med* 15: 361–387.
18. Steyerberg EW, Harrell FE Jr, Borsboom GJ, Eijkemans MJ, Vergouwe Y, et al. (2001). Internal validation of predictive models: efficiency of some procedures for logistic regression analysis. *J Clin Epidemiol* 54: 774–781.
19. Voight BF, Peloso GM, Orho-Melander M, Frikke-Schmidt R, Barbalic M, et al. (2012) Plasma HDL cholesterol and risk of myocardial infarction: a mendelian randomisation study. *Lancet* 380: 572–580.
20. Zambon A, Deeb SS, Hokanson JE, Brown BG, Brunzell JD (1998). Common variants in the promoter of the hepatic lipase gene are associated with lower levels of hepatic lipase activity, buoyant LDL, and higher HDL₂ cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18: 1723–1729.
21. Willer CJ, Sanna S, Jackson AU, Scuteri A, Bonnycastle LL, et al. (2008) Newly identified loci that influence lipid concentrations and risk of coronary artery disease. *Nat Genet* 40: 161–169.
22. Aulchenko YS, Ripatti S, Lindqvist I, Boomsma D, Heid IM, et al. (2009) Loci influencing lipid levels and coronary heart disease risk in 16 European population cohorts. *Nat Genet* 41: 47–55.
23. Dugi KA, Brandauer K, Schmidt N, Nau B, Schneider JG, et al. (2001) Low hepatic lipase activity is a novel risk factor for coronary artery disease. *Circulation* 104: 3057–3062.
24. Hodis HN, Mack WJ, Azen SP, Alaupovic P, Pogoda JM, et al. (1994) Triglyceride- and cholesterol-rich lipoproteins have a differential effect on mild/moderate and severe lesion progression as assessed by quantitative coronary angiography in a controlled trial of lovastatin. *Circulation* 90: 42–49.
25. Zambon A, Deeb SS, Brown BG, Hokanson JE, Brunzell JD (2001). Common hepatic lipase gene promoter variant determines clinical response to intensive lipid-lowering treatment. *Circulation* 103: 792–798.
26. Klein S, Hage JJ (2006) Measurement, calculation, and normal range of the ankle-arm index: a bibliometric analysis and recommendation for standardization. *Ann Vasc Surg* 20: 282–292.
27. Eller P, Schgoer W, Mueller T, Tancevski I, Wehinger A et al. (2005) Hepatic lipase polymorphism and increased risk of peripheral arterial disease. *J Intern Med* 258: 344–348.
28. Valdivielso P, Ariza MJ, de la Vega-Román C, González-Alegre T, Rioja J, et al. (2008) Association of the -250G/A promoter polymorphism of the hepatic lipase gene with the risk of peripheral arterial disease in type 2 diabetic patients. *J Diabetes Complications* 22: 273–277.

c. Conclusion :

Ce premier travail a donc permis de réévaluer l'impact d'un polymorphisme fréquent et sujet à controverses de *LIPC* sur la maladie coronarienne et sur un marqueur préclinique d'extension de la maladie athéroscléreuse, l'index bras-cheville (ABI). Cet index qui constitue un outil de choix dans le cadre du dépistage de l'artériopathie des membres inférieurs est également un marqueur prédictif des événements secondaires chez les coronariens (Newman *et al.*, 1999) et il a récemment été montré dans l'étude GENES que c'est un marqueur pronostique indépendant de mortalité (toutes causes confondues) (Bouisset *et al.*, 2012). Il est ainsi clairement apparu que l'allèle T (muté) est plus fréquent chez les cas que chez les contrôles (fréquence allélique de 0.246 *versus* 0.192, $p=0.003$) avec 39 homozygotes T chez les cas contre 12 chez les témoins. Après de multiples ajustements sur des facteurs de risque établis, il s'avère que l'homozygotie TT confère un risque accru de maladie coronarienne (OR=3,41 ; CI : 1,22-9,59) qui, de façon étonnante, est modulé en fonction de la concentration sérique en triglycérides. Chez des sujets normotriglycéridémiques (<1,5g/L), l'homozygotie TT est fortement associée à la maladie (OR=6,4 ; IC=1,8-22,3) alors que dans des situations d'hypertriglycéridémie ($\geq 1,5$ g/L) cette association n'est plus observée (OR=1,34 ; IC=0,3-5,9). Par ailleurs, les porteurs de l'allèle T sont retrouvés plus fréquemment chez les cas ayant un ABI péjoratif que chez ceux ayant un ABI normal (fréquence allélique de 0.30 *versus* 0.20, $p=0.03$).

Plusieurs fonctions de la LH vont en faveur d'un rôle anti-athérogène, que ce soit pour son rôle-clé dans l'étape ultime du RCT ou dans la dégradation des IDL et des particules remnants dérivées des lipoprotéines riches en triglycérides. Cependant, dans des situations d'hypertriglycéridémie et d'insulinorésistance, lorsque les HDL et les LDL sont riches en triglycérides, la LH pourrait favoriser la formation de LDL petites et denses et accélérer le catabolisme des HDL athéroprotectrices. Cette fonction duale est bien mise en évidence dans notre étude puisque l'impact du variant sur la maladie dépend de la concentration sérique en triglycérides. Dans des conditions normotriglycéridémiques, le variant qui est de moindre activité enzymatique, pourrait ainsi ralentir le transport retour du cholestérol et en conséquence être responsable d'une moins bonne élimination du cholestérol cellulaire excédentaire. Inversement, en cas d'hypertriglycéridémie, il se pourrait que l'activité diminuée du variant protège contre la formation trop importante de LDL petites et denses

connues pour être hautement athérogènes. Également, le ralentissement du catabolisme des HDL pourrait contribuer à prolonger leur temps de résidence plasmatique, leur permettant d'exercer leurs fonctions athéroprotectrices sur les cellules vasculaires.

Cette étude apporte donc un nouveau regard sur la maladie coronarienne en mettant en avant l'association de l'allèle -514T à la fois à la maladie coronarienne mais aussi à une valeur péjorative d'ABI, marqueur de sévérité de la maladie et de progression de l'athérosclérose chez les patients coronariens (Bouisset *et al*, 2012).

B) Résultats préliminaires dans l'étude des mutations touchant *P2RY13* et impactant le métabolisme lipidique :

a. Introduction :

Afin de confirmer l'importance physiologique du récepteur P2Y₁₃ dans le métabolisme du HDL-cholestérol (HDL-C), nous avons évalué s'il existait chez l'homme des polymorphismes ou mutations susceptibles d'impacter son métabolisme ainsi que de manière plus générale le métabolisme lipidique et la maladie coronarienne. C'est pourquoi, nous avons décidé d'étudier la séquence du récepteur P2Y₁₃ chez les témoins et patients coronariens de l'étude GENES décrite dans la section précédente. Dans un premier temps, nous avons séquencé la partie codante de *P2RY13* chez 173 témoins et 168 cas présentant des taux d'apoA-I extrêmes (<0.92 g/L pour les cas et <1.20g/L pour les témoins (valeurs basses) et >1.67g/L pour les cas et >1.93g/L pour les témoins (valeurs hautes)). Dans un deuxième temps, nous avons génotypé chez l'ensemble des sujets les deux mutations qui étaient les plus fréquemment retrouvées : une mutation synonyme codant pour une isoleucine en position 80 (segment transmembranaire) et une mutation non synonyme impactant l'acide aminé 179 (méthionine remplacée par une thréonine, M179T, quatrième segment transmembranaire).

b. Matériel et méthodes :

i. Séquençage :

P2RY13 est un gène mesurant environ 3.4 kb, il est composé de deux exons qui codent une protéine de 354 acides aminés (NP_795713.2). Une PCR initiale a été effectuée en utilisant des amorces encadrant les deux exons (séquences données en 5'-3', amorce sens : AGCAAATGTCCCAAAGGTCT, amorce anti-sens : GGCCATTTGTATCCTGTTGC). La PCR a consisté en un mélange de 5µL d'ADN, 1µL de chaque amorce (10µM), 0.25µL d'AmpliTaq® Gold (Applied Biosystems, 5U/µL), 4µL de MgCl₂ (25µM), 1µL de dNTP, QSP 50µL d'eau. Après 40 cycles d'amplification, une électrophorèse en gel d'agarose 1.5% a été réalisée afin de s'assurer de la validité de la PCR. Les amplicons ont ensuite été purifiés sur colonnes NucleoSpin Extract II de Macherey-Nagel selon les instructions du fournisseur. Les réactions de séquence ont alors été réalisées en mélangeant 20 à 40 ng d'ADN, 3.2µL d'amorce (1µM), 0.8µL de Big Dye terminator v3.1, 1.5µL de tampon 5X, QSP 10µL d'eau ultrapure. La lecture

dans les deux sens de la séquence a nécessité l'utilisation de cinq amorces, trois amorces sens (A : AGCAAATGTCCCAAAGGTCT, B : CACCTGTGAATGAGGCAGAA, C : AGGGCTCATAGCCTTTGACA) et deux amorces anti-sens (D : TTGCATCACTGTGGTGTTCa, E : GGCCATTTGTATCCTGTTGC). Le programme utilisé pour réaliser les réactions de séquence était le suivant : 95°C pendant 5 minutes, 25 cycles comprenant 15 secondes à 96°C, 7 secondes à 50°C et 4 minutes à 60°C suivi d'un refroidissement terminal à 4°C pour conservation. La purification des séquences a été réalisée à la plate-forme génomique GeT de Purpan par précipitation à l'éthanol-EDTA-acétate de sodium avant que les réactions de séquence ne soient lues sur un analyseur Applied Biosystems 3130. L'analyse a ensuite été réalisée grâce au logiciel SeqScape v2.5 permettant de comparer les séquences de chaque sujet à la séquence de référence issue des bases de données.

ii. **Génotypage :**

Après détermination de la concentration de chaque échantillon par Nanodrop, les concentrations ont été ajustées à 4 ng/μL. Le génotypage a ensuite été réalisé à l'aide de sondes TaqMan® correspondant au rs3732757 (mutation synonyme en position 80, I80i) et au rs1466684 (M179T) selon le protocole suivant : 95°C pendant 10 minutes, 40 cycles comprenant 15 secondes à 95°C et 1 minute à 60°C suivi d'une étape finale à 75°C pendant 10 minutes. Ces analyses ont été réalisées sur Light Cyclor 480.

c. Résultats:

Le **séquençage** chez 168 cas et 173 témoins a permis de mettre en évidence de façon ponctuelle quatre mutations dans la séquence non codante et quatre mutations dans la séquence codante (une mutation synonyme impactant l'acide aminé 86, A113D, V266A et R290G, figure 1). Ces mutations ponctuelles ont toutes été retrouvées de façon hétérozygote : la mutation en 86 est trouvée une fois chez un cas, A113D deux fois chez des témoins, V266A chez un cas et R290G chez un témoin et deux cas.

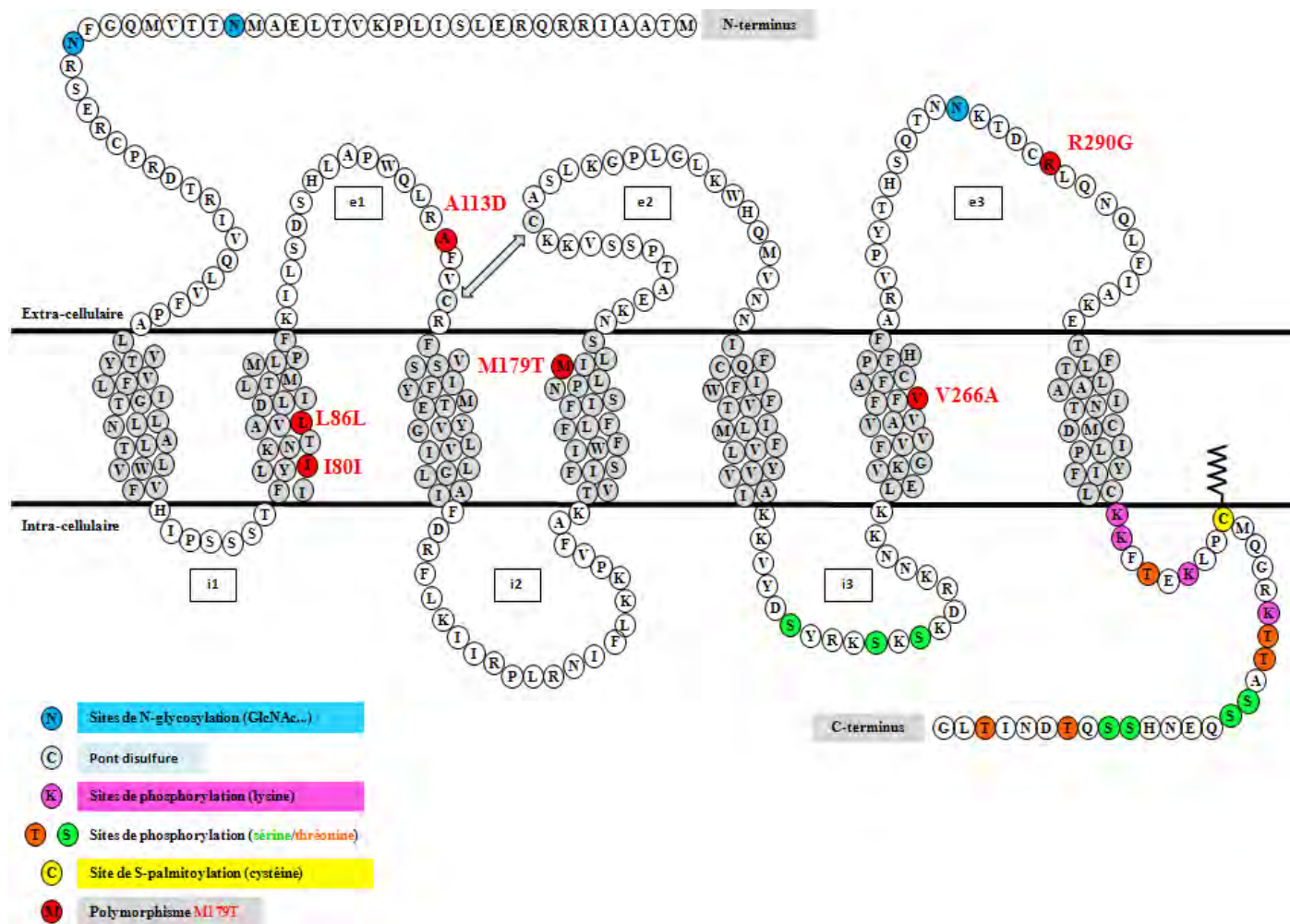


Figure 1 : Localisation des acides aminés impactés par les différentes mutations retrouvées dans la partie codante du récepteur P2Y₁₃.

Deux autres mutations sont plus fréquemment retrouvées, elles impactent les acides aminés en positions 80 (mutation silencieuse) et 179 (une méthionine donne une thréonine) (figure 1).

Suite à ces premiers résultats, nous avons alors **génomé** les deux mutations les plus fréquentes dans l'ensemble de la population, I80i et M179T. Nous avons retrouvé des fréquences alléliques similaires à celles calculées lors du séquençage (0.152 pour l'allèle T en position 179 et 0.045 pour l'allèle i en position 80, résultats similaires chez les cas et les témoins). Le tableau 1 ci-après montre la répartition pour chaque génotype des allèles chez les cas et les témoins. Les calculs montrent par ailleurs que la population se trouve bien en équilibre de Hardy-Weinberg ($\chi^2=0.42$ pour la mutation I80i, $\chi^2=2.41$ pour la mutation M179T).

M179T	0 (MM)	1 (MT)	2 (TT)	I80i	0 (II)	1 (Ii)	2 (ii)
Cas	72.6% (557)	24.3% (186)	3.1% (24)	Cas	91.1% (687)	8.7% (66)	0.1% (1)
Témoins	72.1% (569)	25.4% (200)	2.5% (20)	Témoins	91.2% (720)	8.6% (68)	0.1% (1)

Tableau 1 : Répartition des différents génotypes dans chaque population. Chaque génotype est exprimé en pourcentage avec entre parenthèses, le nombre de sujets.

Nous avons ensuite regardé l'influence de chacun de ces génotypes sur les différents paramètres en notre possession (association génotypes - phénotypes, tableaux 2 et 3).

- Génotypage en position 80 :

I80i	Cas		Témoins		p gène	p cas/témoins	p interaction
Génotype	0	1-2	0	1-2			
Effectif	687	67	720	70			
Cholestérol total (g/L)	2.01 (0.44)	1.95 (0.43)	2.23 (0.38)	2.32 (0.36)	0.74	0.001	0.06
HDL-C (g/L)	0.43 (0.12)	0.44 (0.15)	0.55 (0.13)	0.58 (0.15)	0.09	0.001	0.54
Triglycérides [#] (g/L)	1.70 (1.00)	1.61 (0.88)	1.20 (0.71)	1.28 (1.14)	0.71	0.001	0.44
ApoA-I (g/L)	1.24 (0.23)	1.27 (0.24)	1.52 (0.24)	1.56 (0.28)	0.12	0.001	0.76
IF1* (mg/L)	0.43 (0.13)	0.47 (0.15)	0.53 (0.15)	0.56 (0.17)	0.01	0.001	0.82
ApoB (g/L)	1.03 (0.25)	1.00 (0.25)	1.06 (0.22)	1.10 (0.23)	0.97	0.003	0.14
LpA1 (g/L)	0.47 (0.15)	0.49 (0.16)	0.56 (0.17)	0.60 (0.20)	0.04	0.001	0.35
Lp(a) [#] (g/L)	0.46 (0.45)	0.49 (0.39)	0.29 (0.36)	0.27 (0.40)	0.79	0.001	0.33
Gamma-GT [#] (UI/L)	64.8 (76.1)	55.6 (48.3)	45.8 (54.0)	44.2 (42.2)	0.39	0.001	0.83
CRP [#] (mg/L)	13.5 (23.0)	11.8 (16.4)	3.1 (6.1)	3.2 (5.9)	0.51	0.001	0.96
Alcool [#] (g/jour)	28.8 (31.4)	22.9 (23.5)	24.0 (23.5)	23.3 (22.1)	0.34	0.23	0.14
Indice de masse corporelle [#] (g/cm ²)	27.4 (3.9)	27.5 (5.1)	26.7 (3.3)	27.0 (4.5)	0.61	0.09	0.93
Masse grasse* (%)	27.9 (5.3)	29.3 (5.9)	26.1 (5.1)	27.3 (5.2)	0.02	0.001	0.67
Tour de taille (cm)	98.9 (10.6)	99.9 (13.7)	95.1 (9.5)	96.3 (10.5)	0.22	0.001	0.95
Glucose (mmol/L)	6.00 (2.14)	5.75 (1.66)	5.45 (1.11)	5.30 (0.67)	0.18	0.001	0.74
Insuline ^{**} (UI/L)	15.8 (19.9)	19.6 (37.5)	10.0 (7.0)	10.1 (8.7)	0.74	0.001	0.72
Adiponectine* (mg/L)	5.6 (4.4)	5.8 (4.7)	7.1 (4.5)	8.7 (5.4)	0.09	0.001	0.18
Index HOMA ^{**}	4.4 (6.1)	6.6 (23.3)	2.6 (2.5)	2.5 (2.7)	0.95	0.001	0.79
Pression artérielle systolique (mmHg)	139 (21)	143 (21)	137 (16)	136 (15)	0.32	0.003	0.14
Fréquence cardiaque (battements/min)	64.2 (12.1)	62.2 (9.0)	63.7 (9.3)	61.4 (9.7)	0.03	0.47	0.85

Tableau 2 : Caractéristiques des cas et témoins selon leur génotype (0=sauvage, 1=hétérozygote, 2=homozygote variant). CRP : protéine C réactive, GGT : gamma glutamyl transférase, HOMA : homeostasis model assessment, Lp(a) : lipoprotéine (a). p cas : effet du polymorphisme seul, p cas/témoins : significativité cas *versus* témoins indépendamment du génotype, p interaction : effet du génotype dépendant ou non du statut cas-témoin. * : ces paramètres n'ont pas pu être déterminés sur l'ensemble de la population. Par souci de simplification, le nombre exact d'individus n'a pas été indiqué. Entre parenthèses, sont mentionnés les écart-types. # : analyses effectuées sur des données transformées en log.

Dans le cas de la mutation silencieuse I80i, nous observons une augmentation significative du taux de la lipoparticule LpA1 (HDL constituée uniquement d'apoA-I) sans

modification du taux HDL-C quel que soit le groupe. Si on attribue l'augmentation du taux de LpA1 à une diminution de son catabolisme, cela suggérerait une moindre fonctionnalité et/ou expression du récepteur P2Y₁₃ puisque le catabolisme de la LpA1 semble être diminué. En parallèle de cela, nous trouvons également une augmentation significative des taux d'IF1. Pour rappel, cette protéine classiquement connue pour être un inhibiteur naturel de l'activité ATPasique de l'ATP synthase mitochondriale est également capable d'inhiber l'ecto-F₁-ATPase de surface. L'association que nous retrouvons ici avec un polymorphisme du récepteur P2Y₁₃ est donc un argument supplémentaire en faveur de son couplage à l'ecto-F₁-ATPase. La mutation I80i est également associée de façon inattendue à une augmentation de la masse grasse ainsi qu'une diminution significative de la fréquence cardiaque. Des analyses complémentaires, explorant l'état cardio-vasculaire ont par ailleurs été effectuées chez les patients coronariens. La sévérité de la maladie évaluée par certains scores (Gensini, Jeopardy) n'est pas différente selon le génotype. En revanche, nous constatons une amélioration de l'index bras-cheville chez les sujets Ii et ii (34.6% d'ABI péjoratif chez les sujets II contre 22.4% chez les sujets Ii et ii, p=0.05). Enfin, nous constatons également que le pourcentage de sujets ayant une fraction d'éjection ventriculaire gauche diminuée (<0.50) est moins important chez les sujets Ii et ii que chez les sujets II (17.9% *versus* 27.9%, p=0.09). Cette mutation serait donc associée à un phénotype plutôt protecteur même si se pose la question de la masse grasse qui est significativement plus élevée chez les porteurs de la mutation que chez les autres.

- Génotypage en position 179 :

M179T	Cas			Témoins			p gène	p cas/témoins	p interaction
Génotype	0	1	2	0	1	2			
Effectif	557	186	24	569	200	20			
Cholestérol total (g/L)	1.99 (0.42)	2.05 (0.46)	2.06 (0.60)	2.24 (0.37)	2.21 (0.40)	2.37 (0.32)	0.29	0.001	0.14
HDL-C (g/L)	0.43 (0.12)	0.44 (0.13)	0.44 (0.15)	0.55 (0.13)	0.56 (0.13)	0.52 (0.10)	0.31	0.001	0.39
Triglycérides [#] (g/L)	1.70 (1.00)	1.71 (0.98)	1.75 (1.34)	1.23 (0.81)	1.16 (0.63)	1.17 (0.48)	0.87	0.001	0.63
ApoA-I (g/L)	1.23 (0.22)	1.27 (0.23)	1.25 (0.26)	1.52 (0.25)	1.53 (0.24)	1.45 (0.18)	0.19	0.001	0.35
IF1* (mg/L)	0.43 (0.13)	0.45 (0.13)	0.37 (0.12)	0.53 (0.15)	0.53 (0.16)	0.53 (0.10)	0.25	0.001	0.13
ApoB (g/L)	1.02 (0.25)	1.05 (0.25)	1.03 (0.32)	1.07 (0.22)	1.06 (0.22)	1.13 (0.21)	0.60	0.03	0.20
LpA1 (g/L)	0.47 (0.15)	0.48 (0.16)	0.48 (0.14)	0.55 (0.18)	0.58 (0.18)	0.51 (0.19)	0.16	0.001	0.43
Lp(a)[#] (g/L)	0.44 (0.43)	0.51 (0.47)	0.54 (0.52)	0.28 (0.34)	0.29 (0.35)	0.56 (0.74)	0.008	0.001	0.25
Gamma-GT [#] (UI/L)	64.0 (74.1)	67.8 (77.2)	52.0 (29.3)	46.5 (58.1)	43.2 (37.5)	38.1 (20.4)	0.93	0.001	0.57
CRP [#] (mg/L)	12.9 (21.8)	13.4 (22.8)	22.2 (30.9)	3.0 (4.8)	3.1 (5.9)	3.0 (4.3)	0.18	0.001	0.73
Alcool [#] (g/jour)	27.3 (29.6)	30.2 (34.3)	33.7 (38.7)	23.9 (24.4)	24.4 (21.1)	19.8 (15.5)	0.30	0.97	0.99
IMC [#] (g/cm ²)	27.3 (4.0)	27.7 (4.3)	27.7 (2.8)	26.8 (3.6)	26.8 (3.4)	25.6 (2.7)	0.49	0.007	0.30
Masse grasse* (%)	28.0 (5.4)	28.0 (5.3)	27.8 (4.9)	26.4 (5.0)	26.1 (5.4)	24.2 (3.8)	0.35	0.001	0.53
Tour de taille (cm)	98.9 (10.7)	99.1 (11.5)	100.4 (10.1)	95.3 (9.9)	95.6 (9.2)	92.1 (7.9)	0.77	0.001	0.32
Glucose (mmol/L)	5.95 (2.12)	6.08 (1.96)	5.45 (0.95)	5.49 (1.16)	5.38 (0.84)	5.07 (0.54)	0.19	0.004	0.46
Insuline* [#] (UI/L)	14.9 (21.7)	14.9 (22.9)	21.0 (18.7)	9.9 (7.9)	10.1 (6.8)	8.1 (3.0)	0.58	0.001	0.17
Adiponectine* (mg/L)	5.5 (4.4)	5.9 (4.5)	3.8 (1.8)	7.4 (4.8)	6.7 (4.2)	7.7 (5.1)	0.72	0.001	0.17
Index d'HOMA* [#]	4.6 (12.4)	3.9 (5.3)	4.7 (4.2)	2.6 (2.7)	2.4 (1.7)	1.9 (0.8)	0.92	0.001	0.35
PAS (mmHg)	139 (21)	140 (20)	140 (23)	137 (16)	137 (15)	134 (12)	0.89	0.06	0.70
FC (battements/min)	63.9 (12.5)	64.6 (11.1)	65.3 (8.3)	63.4 (9.4)	63.8 (9.1)	63.4 (9.1)	0.62	0.36	0.92

Tableau 3 : Caractéristiques des cas et témoins selon leur génotype (0=sauvage (MM), 1=hétérozygote (MT), 2=homozygote variant (TT)). CRP : protéine C réactive, FC : fréquence cardiaque, GGT : gamma glutamyl transférase, HOMA : homeostasis model assessment, IMC : indice de masse corporelle, Lp(a) : lipoprotéine (a), PAS : pression artérielle systolique. p cas : effet du polymorphisme seul, p cas/témoins : significativité cas *versus* témoins indépendamment du génotype, p interaction : effet du génotype dépendant ou non du statut cas-témoin. * : ces paramètres n'ont pas pu être déterminés sur l'ensemble de la population. Par souci de simplification, le nombre exact d'individus n'a pas été indiqué. Entre parenthèses, sont mentionnés les écart-types. # : analyses effectuées sur des données transformées en log.

Tout d'abord, contrairement à la mutation silencieuse I80I, on ne retrouve pas de lien entre les différents allèles de la mutation M179 et certains marqueurs tels que γ GT, CRP, pression artérielle systolique, indice de masse corporelle, fréquence cardiaque, marqueurs du métabolisme glucidique (glucose, insuline, adiponectine) ou encore les taux sériques d'IF1. Le seul marqueur variant selon le génotype est de façon inattendue la lipoprotéine (a) ou Lp(a). Cette particule de structure similaire à une lipoprotéine LDL possède une apoB-100 qui est liée par un pont disulfure à une apo(a) unique. Elle est actuellement considérée comme marqueur du risque cardio-vasculaire. Parmi les mécanismes proposés, la Lp(a) s'oppose à la fibrinolyse (en diminuant l'activation du plasminogène du fait de sa forte homologie avec lui), augmente l'adhésion et la migration des monocytes ou bien encore favorise la migration et la prolifération des cellules musculaires lisses et des cellules endothéliales (Malaguarnera *et al.*, 2013). Son catabolisme n'est pas totalement compris mais semble passer par différents récepteurs : LDLR (hépatocytes), VLDLR (fibroblastes) et mégaline/330gp (fibroblastes). Il existe également un désassemblage de la Lp(a) dans le sang périphérique suivi d'une dégradation dans différents tissus puis d'une excrétion urinaire des différents fragments (Hoover-Plow & Huang, 2013). Il ne semble toutefois pas y avoir d'implication des récepteurs purinergiques dans ce métabolisme. Les taux de Lp(a) montrent une grande variabilité entre les individus, vraisemblablement d'origine génétique, et une grande constance chez un même individu. Aucun traitement hypolipémiant n'a pour l'instant démontré une réelle efficacité pour diminuer ses taux, à l'exception d'un effet possible de la niacine, contribuant sans doute à la difficulté d'attribuer à la Lp(a) le statut de facteur de risque. Classiquement, le locus apo(a) est l'objet d'un polymorphisme de répétition conditionnant à la fois le taux sérique de la Lp(a) et le risque de développer une maladie coronarienne (Kamstrup *et al.*, 2008). L'association potentielle de la mutation M179T avec des taux élevés de Lp(a), si elle se confirmait dans d'autres études, pourrait constituer un nouveau facteur génétique de variabilité de ce marqueur de risque athéro-thrombogène.

Concernant les scores évaluant la sévérité de la maladie (Gensini, Jeopardy), nous n'avons pas constaté de différence selon le génotype. Il en va de même pour l'index brachiocheville ou la fraction d'éjection ventriculaire gauche.

- Combinaison des deux génotypes (I80i et M179T) :

Lors de ces analyses, il nous est clairement apparu que ces deux mutations semblaient être en déséquilibre de liaison. En effet, nous ne retrouvons pas l'association des doubles homozygotes variant (de génotype 2/2) ce qui implique que trois génotypes ne sont pas retrouvés dans notre étude : il/TT, ii/TT et ii/TM. Nous serions donc dans un système tri-allélique avec les trois allèles suivants :

a_0 : acide aminé sauvage en position 80 et muté en 179 (IT).

a_1 : acides aminés sauvages en 80 et 179 (IM).

a_2 : acide aminé dont l'isoleucine en position 80 est codée par le codon variant et acide aminé sauvage en 179 (iM).

Ce postulat permet ainsi de vérifier si notre échantillonnage répond bien à l'équilibre de Hardy-Weinberg, ce qui semble être le cas (tableau 4). Le calcul des fréquences observées des allèles variants iM et IT (0.044 et 0.154 respectivement) montre par ailleurs des résultats strictement identiques aux fréquences observées des mutations i et T.

	Cas			Témoins	
	Nombre de génotypes observés	Effectif attendu selon HW		Nombre de génotypes observés	Effectif attendu selon HW
a_1/a_1	483	475,7		508	501,1
a_2/a_2	1	1,5		1	1,5
a_0/a_0	24	17,8		21	18,2
a_1/a_2	53	53,6		51	54,6
a_1/a_0	170	184,0		181	191,1
a_0/a_2	12	10,4		15	10,4
n	743	743		777	776,9

Tableau 4 : calcul du nombre attendu de cas et de témoins si notre population ne s'éloigne pas de l'équilibre de Hardy-Weinberg. Comparaison à ce que nous observons dans notre population.

Nous pouvons alors procéder à une analyse entre chacun des haplotypes et les caractéristiques bio-cliniques analysées, comme nous l'avons fait précédemment pour chaque génotype (tableau 5).

Double génotypage	Cas					Témoins					p gène	p cas/témoins	p interaction
Génotype	a ₁ /a ₁	a ₁ /a ₀	a ₀ /a ₀	a ₀ /a ₂	a ₁ /a ₂ + a ₂ /a ₂	a ₁ /a ₁	a ₁ /a ₀	a ₀ /a ₀	a ₀ /a ₂	a ₁ /a ₂ + a ₂ /a ₂			
Effectif	482	168	23	12	54	507	181	20	15	53			
Cholestérol total (g/L)	1.99 (0.42)	2.06 (0.46)	2.04 (0.61)	2.01 (0.41)	1.94 (0.44)	2.24 (0.37)	2.20 (0.42)	2.37 (0.32)	2.32 (0.33)	2.32 (0.37)	0.63	0.001	0.09
HDL-C (g/L)	0.43 (0.11)	0.45 (0.13)	0.43 (0.14)	0.41 (0.12)	0.45 (0.15)	0.55 (0.13)	0.56 (0.13)	0.52 (0.10)	0.57 (0.11)	0.58 (0.16)	0.06	0.001	0.65
Triglycérides [#] (g/L)	1.70 (0.99)	1.69 (0.97)	1.78 (1.37)	1.94 (1.25)	1.54 (0.78)	1.22 (0.74)	1.16 (0.64)	1.17 (0.48)	1.19 (0.45)	1.32 (1.28)	0.89	0.001	0.83
ApoA-I (g/L)	1.23 (0.22)	1.28 (0.24)	1.23 (0.25)	1.22 (0.24)	1.28 (0.24)	1.52 (0.24)	1.53 (0.25)	1.45 (0.18)	1.58 (0.18)	1.57 (0.30)	0.08	0.001	0.59
IF1* (mg/L)	0.42 (0.13)	0.45 (0.13)	0.37 (0.12)	0.45 (0.15)	0.47 (0.15)	0.53 (0.15)	0.52 (0.16)	0.53 (0.10)	0.55 (0.16)	0.57 (0.18)	0.03	0.001	0.28
ApoB (g/L)	1.02 (0.25)	1.05 (0.25)	1.02 (0.33)	1.06 (0.24)	0.99 (0.25)	1.07 (0.22)	1.05 (0.23)	1.13 (0.21)	1.11 (0.18)	1.10 (0.25)	0.82	0.02	0.22
LpA1 (g/L)	0.47 (0.15)	0.48 (0.16)	0.46 (0.11)	0.48 (0.18)	0.49 (0.16)	0.55 (0.17)	0.58 (0.18)	0.51 (0.19)	0.61 (0.13)	0.60 (0.22)	0.03	0.001	0.65
Lp(a) [#] (g/L)	0.44 (0.44)	0.51 (0.48)	0.51 (0.50)	0.55 (0.34)	0.46 (0.40)	0.28 (0.33)	0.30 (0.36)	0.56 (0.74)	0.22 (0.23)	0.29 (0.44)	0.08	0.001	0.38
Gamma-GT [#] (UI/L)	64.2 (77.1)	69.6 (80.1)	51.1 (29.6)	53.7 (44.7)	55.5 (49.7)	46.7 (59.8)	43.9 (37.6)	38.1 (20.4)	39.4 (40.7)	46.2 (43.5)	0.76	0.001	0.79
CRP [#] (mg/L)	13.0 (22.4)	13.9 (23.6)	21.4 (31.4)	11.7 (13.6)	11.6 (17.0)	2.9 (4.6)	3.2 (6.1)	2.9 (4.3)	1.7 (2.2)	3.7 (6.6)	0.44	0.001	0.37
Alcool [#] (g/jour)	27.6 (30.1)	31.8 (35.4)	29.3 (32.7)	16.8 (17.3)	24.3 (24.8)	23.9 (24.6)	25.3 (21.4)	19.8 (15.5)	17.8 (18.1)	25.6 (23.1)	0.23	0.36	0.58
Indice de masse corporelle [#] (g/cm ²)	27.3 (3.9)	27.5 (4.2)	27.7 (2.9)	28.6 (5.0)	27.3 (5.1)	26.8 (3.3)	26.9 (3.4)	25.6 (2.7)	26.4 (2.9)	27.1 (4.9)	0.81	0.007	0.48

Masse grasse* (%)	27.9 (5.3)	27.8 (5.3)	27.3 (4.6)	31.0 (4.1)	29.0 (6.3)	26.2 (4.9)	26.1 (5.5)	24.2 (3.8)	27.1 (5.0)	27.4 (5.4)	0.05	0.001	0.82
Tour de taille (cm)	98.8 (10.5)	98.9 (11.4)	100.3 (10.3)	100.7 (12.1)	99.9 (14.2)	95.1 (9.7)	95.7 (9.3)	92.1 (8.0)	95.8 (8.4)	96.4 (11.3)	0.69	0.001	0.66
Glucose (mmol/L)	5.97 (2.19)	6.11 (2.03)	5.46 (0.97)	5.64 (1.27)	5.80 (1.75)	5.50 (1.21)	5.38 (0.84)	5.07 (0.54)	5.22 (0.66)	5.35 (0.67)	0.29	0.007	0.78
Insuline* [#] (UI/L)	13.9 (14.7)	13.1 (21.5)	18.7 (17.4)	29.0 (31.1)	23.2 (55.7)	9.8 (7.5)	10.1 (7.1)	8.1 (3.0)	10.8 (5.3)	8.7 (4.9)	0.50	0.001	0.24
Adiponectine* (mg/L)	5.5 (4.4)	5.9 (4.6)	3.7 (1.7)	6.9 (4.7)	5.6 (4.8)	7.3 (4.8)	6.5 (3.8)	7.7 (5.1)	9.4 (7.1)	8.6 (4.9)	0.35	0.001	0.20
Index d'HOMA* [#]	4.0 (6.2)	3.5 (5.0)	4.2 (3.9)	6.5 (6.7)	10.3 (36.4)	2.6 (2.6)	2.4 (1.8)	1.8 (0.7)	2.5 (1.4)	2.1 (1.2)	0.81	0.001	0.40
Pression artérielle systolique (mmHg)	139 (21)	140 (20)	141 (23)	139 (23)	144 (21)	137 (17)	137 (14)	134 (12)	140 (22)	136 (12)	0.79	0.05	0.41
Fréquence cardiaque (battements/min)	64.0 (12.6)	64.5 (10.9)	65.3 (8.4)	63.8 (7.6)	61.9 (9.4)	63.5 (9.2)	64.2 (9.2)	63.4 (9.1)	59.9 (8.1)	61.9 (10.2)	0.26	0.24	0.92

Tableau 5 : Caractéristiques des cas et témoins selon leur double génotype (mutations I80i et M179T). CRP : protéine C réactive, GGT : gamma glutamyl transférase, HOMA : homeostasis model assessment, Lp(a) : lipoprotéine (a). p cas : effet du polymorphisme seul, p cas/témoins : significativité cas *versus* témoins indépendamment du génotype, p interaction : effet du génotype dépendant ou non du statut cas-témoin. * : ces paramètres n'ont pas pu être déterminés sur l'ensemble de la population. Par souci de simplification, le nombre exact d'individus n'a pas été indiqué. Entre parenthèses, sont mentionnés les écart-types. [#] : analyses effectuées sur des données transformées en log.

Nous retrouvons donc des résultats similaires à ceux obtenus précédemment (quand chaque génotype était pris de façon indépendante) avec toutefois une atténuation des effets dans ce double génotypage. C'est en particulier le cas pour l'index bras-cheville, la fréquence cardiaque ou la Lp(a) dont les associations ne sont pas retrouvées significatives dans cette analyse par haplotype. Enfin, de façon intéressante, nous trouvons une tendance (non significative) à l'augmentation des taux sériques de HDL-C et d'apoA-I chez les variants en position 80 ($p=0.06$ et $p=0.08$ respectivement).

d. Discussion :

Cette étude cas-témoins a ainsi permis de mettre en évidence deux mutations fréquentes de *P2RY13* (mutation synonyme en position 80 concernant une isoleucine – I80I, mutation faux-sens en position 179 avec une méthionine qui donne une thréonine – M179T).

La mutation synonyme I80I apparaît comme étant la mutation la plus intéressante à étudier. Elle est notamment associée à une augmentation significative des taux de LpA1 ($p=0.04$) et d'IF1 ($p=0.01$). La lipoparticule LpA1 est une HDL contenant exclusivement de l'apoA-I, elle contient environ 35% de l'apoA-I plasmatique et se retrouve principalement dans les HDL-2 (Asztalos *et al.*, 2006). Nous avons vu précédemment que les HDL-2 sont métabolisées par le foie par l'intermédiaire de deux types de récepteurs : un site de basse affinité pour les HDL-2 riches en triglycérides et un site de basse affinité associé à un site de haute affinité pour les remnants de HDL-2 (K Guendouzi *et al.*, 1999). Il se pourrait donc que cette mutation, associée à l'augmentation de la concentration en LpA1 soit de type perte de fonction ou responsable d'une moindre expression du récepteur P2Y₁₃ à la membrane des hépatocytes. L'absence d'effet sur les taux de HDL-C serait alors expliquée par l'hétérogénéité de cette classe lipoprotéique : 65% de l'apoA-I est retrouvée dans les LpA1:A2 qui prédominent dans les HDL-3 (précurseurs des HDL-2 dans la circulation sanguine), il y aurait donc compensation de l'augmentation des taux de LpA1 par les HDL-3. Concernant l'augmentation des taux d'IF1, deux hypothèses peuvent être émises. La première repose sur le fait qu'IF1 est présent naturellement à la surface cellulaire où il est lié à l'ecto-F₁-ATPase et entre en compétition avec l'apoA-I (Cavelier, Ohnsorg, Rohrer, & Eckardstein, 2012; Giorgio *et al.*, 2010; Radojkovic *et al.*, 2009). Une augmentation des taux

de LpA1 pourrait donc être responsable d'un déplacement par l'IF1 de sa liaison à l'ecto-F₁-ATPase ayant ainsi pour conséquence d'augmenter ses taux plasmatiques. La deuxième hypothèse se place dans un contexte plus global et prend en compte la fonction première de l'IF1 dans la mitochondrie. En condition de découplage de la chaîne respiratoire (hypoxie ou acidose par exemple), l'ATP synthase mitochondriale ne synthétise plus d'ATP mais l'hydrolyse (activité ATPasique) et, consécutivement à l'acidification de la matrice mitochondriale, IF1 passe d'un état de tétramère inactif en un état de dimère actif et inhibe alors l'activité ATPase de l'enzyme. Il pourrait donc être envisagé que les taux circulants d'IF1 reflètent l'état métabolique respiratoire mitochondrial. Pour expliquer cela, plaçons-nous dans un contexte d'hypoperfusion où l'hypoxie d'un vaisseau stimule la sécrétion d'ATP par les cellules (notamment les érythrocytes mais aussi les cellules endothéliales) (Lohman, Billaud, & Isakson, 2012). Cet afflux massif d'ATP permet ainsi de stimuler la sécrétion, *via* les récepteurs purinergiques P2Y₁ et P2Y₂ (L. O. Martinez, Cabou, Pons, & Malaval, 2012) de monoxyde d'azote (NO) par les cellules endothéliales. Ce puissant vasodilatateur participe alors à améliorer l'oxygénation des cellules environnantes. Il a été montré en 2005 (L. Wang *et al.*, 2005) que le récepteur P2Y₁₃ présent à la surface érythrocytaire jouait un rôle dans le rétrocontrôle négatif de la libération d'ATP par le globule rouge.

Plaçons-nous dans différentes conditions pour émettre des hypothèses sur le mécanisme possible d'augmentation des taux d'IF1 chez le mutant P2Y₁₃ I80i :

- en condition normale d'oxygénation dans une artère coronaire chez un sujet **non variant** pour le codon codant l'isoleucine en position **80** du récepteur P2Y₁₃ :

La sécrétion d'ATP par les érythrocytes est sous contrôle du récepteur P2Y₁₃. L'ATP présent permet un apport en dioxygène suffisant aux cardiomyocytes puisqu'il peut être amené sans problème au-delà des cellules endothéliales. L'IF1 mitochondrial des cardiomyocytes est ainsi relargué de façon constitutive dans la circulation, du fait qu'il n'est pas mobilisé sur l'ATP-synthase mitochondriale.

- en condition d'hypoxie (lors de sténose coronaire par exemple) chez un sujet **non-variant** pour le codon codant l'isoleucine en position **80** du récepteur P2Y₁₃ :

La présence d'une plaque d'athérome s'accompagne d'une diminution du flux sanguin en aval ainsi qu'un appauvrissement en dioxygène. Les érythrocytes sécrètent alors beaucoup plus d'ATP en réponse à ce stress (Bergfeld & Forrester, 1992). Toutefois, le rétro-contrôle de la sécrétion d'ATP *via* le récepteur P2Y₁₃ intervient ce qui se traduit par une vasodilatation insuffisante pour oxygéner les cellules myocardiques. L'IF1 mitochondrial est alors mobilisé pour inhiber l'activité ATP hydrolase mitochondriale expliquant que nous retrouvons IF1 en moindre quantité dans le sérum

- en condition d'hypoxie chez un sujet **variant** pour le codon codant l'isoleucine en position **80** du récepteur P2Y₁₃ :

L'hypoxie s'accompagne là-aussi d'une sécrétion d'ATP par les globules rouges. Toutefois, si nous considérons que la mutation est perte de fonction (ou entraînant une moindre expression du récepteur à la surface cellulaire), le rétro-contrôle sera beaucoup moins efficace et les érythrocytes sécréteront plus d'ATP. Cet apport suffisant en ATP stimule la sécrétion de NO par les cellules endothéliales et la vasodilatation consécutive à cette sécrétion permet un meilleur apport en oxygène aux cardiomyocytes. L'hypoxie est donc réduite (ou limitée) et de ce fait, l'IF1 du cardiomyocyte est moins mobilisé pour inhiber l'activité hydrolytique (ATPasique) de l'ATP synthase mitochondriale. Il est ainsi retrouvé dans le plasma en plus grande quantité que chez un sujet non variant.

Cette hypothèse suppose donc que l'activité inhibitrice de l'IF1 sur l'ATP synthase mitochondriale des cardiomyocytes (c'est-à-dire sa liaison ou sa mobilisation à l'ATP synthase mitochondriale) est inversement proportionnelle aux taux circulants d'IF1.

Jusqu'à présent, nous n'avons toutefois pas eu l'occasion d'évaluer l'effet de cette mutation sur le rétro-contrôle de la sécrétion d'ATP par des érythrocytes. Cette première étape sera donc nécessaire pour valider cette hypothèse. Nous sommes toutefois en train d'évaluer l'expression du récepteur P2Y₁₃ *in vitro* dans des cellules HeLa avec les différents mutants (II, li et ii) afin de savoir si l'impact se porte plus sur l'expression du récepteur ou sa fonctionnalité. En effet, de nouvelles études montrent que les mutations synonymes

peuvent impacter la stabilité des ARNm et ainsi altérer l'expression protéique (Sauna & Kimchi-Sarfaty, 2011). Il sera donc intéressant de voir dans notre cas, l'impact de cette mutation synonyme.

Concernant l'augmentation de masse grasse chez les sujets porteurs de la mutation synonyme, il est intéressant de se référer aux travaux de Biver *et al* (Biver *et al.*, 2013). Ils ont en effet montré que l'activation de P2Y₁₃ inhibe la différenciation adipocytaire (cet effet passant par un rétro-contrôle négatif de la maturation des pré-adipocytes en adipocytes). Ces données vont donc dans le sens de nos résultats : la moindre expression et/ou activité du récepteur P2Y₁₃ n'inhibe plus la différenciation des pré-adipocytes expliquant ainsi une masse grasse supérieure. De façon intéressante, l'indice de masse corporelle n'est pas affecté. Cela rejoint les données de la littérature puisque les GWAS sur l'obésité ou les variations d'IMC n'ont pas mis en évidence de lien avec ce SNP (National Human Genome Research Institute, 2013).

Concernant la mutation M179T, nous sommes en accord avec Amisten *et al* (Stefan Amisten *et al.*, 2008) qui n'avaient retrouvé aucune association entre cette mutation et l'infarctus aigu du myocarde. En effet, les fréquences alléliques de l'acide aminé muté et de l'acide aminé sauvage sont identiques chez les cas et chez les témoins.

Nous pouvons ainsi conclure que ces premiers résultats soulèvent plus de questions qu'ils n'amènent de réponses montrant bien la nécessité d'étudier l'effet des différentes mutations du récepteur P2Y₁₃ *in vitro* sur des cellules transfectées. Nous devons en particulier regarder les différences d'expression de chacun des mutants mais également vérifier la fonctionnalité du récepteur.

C) Rôle du récepteur P2Y₁₃ dans la captation hépatique du cholestérol

a. Introduction

Comme décrit précédemment, notre laboratoire a initialement mis en évidence une voie originale de captation des holoparticules HDL (cholestérol + protéine). Dans cette voie, l'apoA-I libre ou liée stimule l'activité hydrolase de la **F₁-ATPase** ce qui permet de générer de l'ADP à partir d'ATP. L'ADP produit peut alors activer le deuxième acteur de cette voie, le récepteur P2Y₁₃ (Jacquet *et al*, 2005). L'activation de ce récepteur permet ensuite l'activation d'un troisième récepteur qui permet l'endocytose des particules HDL entières.

Bien qu'elle soit bien décrite, l'importance physiologique de cette voie était à l'époque peu claire et son rôle notamment dans le transport retour du cholestérol n'avait pas été exploré *in vivo*. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à l'effet de l'invalidation génique du récepteur P2Y₁₃ chez des souris C57BL/6 et de son impact sur les profils lipidiques plasmatique et hépatique, les sécrétions biliaires mais aussi le transport de cholestérol radiomarké des macrophages vers les fèces. En parallèle de ça, nous avons comparé l'effet de l'administration en *bolus* du cangrelor (un agoniste partiel de P2Y₁₃) sur la capture des HDL et sur les sécrétions biliaires chez des souris sauvages, invalidées pour P2Y₁₃ et invalidées pour le récepteur SR-BI spécifiquement dans le foie.

Mon travail a consisté à l'analyse de l'expression des gènes hépatiques par qPCR dans les groupes de souris sauvages et invalidées pour P2Y₁₃. Brièvement, après extraction des ARN totaux par broyage mécanique à l'aide d'un kit RNeasy®Mini kit (Quiagn), l'ADN génomique contaminant a été éliminé en utilisant de la DNase RNase-free. L'ARN a ensuite été élué dans de l'eau DNase et RNase free avant que sa concentration ne soit mesurée à une longueur d'onde de 260nm. La qualité de chaque ARN a ensuite été vérifiée par électrophorèse capillaire (Agilent® RNA Nano chip). La reverse transcription des ARNm a été effectuée en utilisant la Superscript III Reverse-Transcriptase (Invitrogen) en présence de p(dT) (Roche Diagnostics) et de RNase OUT™ (Invitrogen). Les analyses de qPCR en temps réel ont été réalisées sur un système de PCR en temps réel de Roche (Light Cycler 480) en utilisant du SYBR Green. L'expression hépatique de chaque gène a ainsi été étudiée et comparée à celle de deux gènes de référence, HPRT (hypoxanthine

phosphorybosyltransférase) et TBP (TATA-binding protein). La comparaison d'expression entre les groupes s'est faite à l'aide d'un test de Student bilatéral.

b. Article 2 :

P2Y₁₃ Receptor is Critical for Reverse Cholesterol Transport

Aurélié C. Fabre,^{1,2*} Camille Malaval,^{1,2*} Abduehakeem Ben Addi,^{3*} Céline Verdier,^{1,2} Véronique Pons,^{1,2} Nizar Serhan,^{1,2} Laetitia Lichtenstein,^{1,2} Guillaume Combes,^{1,2} Thierry Huby,⁴ François Briand,⁵ Xavier Collet,^{1,2} Niels Nijstad,⁶ Uwe J.F. Tietge,⁶ Bernard Robaye,³ Bertrand Perret,^{1,2} Jean-Marie Boeynaems,³ and Laurent O. Martinez^{1,2}

A major atheroprotective functionality of high-density lipoproteins (HDLs) is to promote “reverse cholesterol transport” (RCT). In this process, HDLs mediate the efflux and transport of cholesterol from peripheral cells and its subsequent transport to the liver for further metabolism and biliary excretion. We have previously demonstrated in cultured hepatocytes that P2Y₁₃ (purinergic receptor P2Y, G protein-coupled, 13) activation is essential for HDL uptake but the potential of P2Y₁₃ as a target to promote RCT has not been documented. Here, we show that P2Y₁₃-deficient mice exhibited a decrease in hepatic HDL cholesterol uptake, hepatic cholesterol content, and biliary cholesterol output, although their plasma HDL and other lipid levels were normal. These changes translated into a substantial decrease in the rate of macrophage-to-feces RCT. Therefore, hallmark features of RCT are impaired in P2Y₁₃-deficient mice. Furthermore, cangrelor, a partial agonist of P2Y₁₃, stimulated hepatic HDL uptake and biliary lipid secretions in normal mice and in mice with a targeted deletion of scavenger receptor class B type I (SR-BI) in liver (hypomSR-BI-knockout^{liver}) but had no effect in P2Y₁₃ knockout mice, which indicate that P2Y₁₃-mediated HDL uptake pathway is independent of SR-BI-mediated HDL selective cholesteryl ester uptake. **Conclusion: These results establish P2Y₁₃ as an attractive novel target for modulating RCT and support the emerging view that steady-state plasma HDL levels do not necessarily reflect the capacity of HDL to promote RCT. (HEPATOLOGY 2010;52:1477-1483)**

The risk of developing atherosclerosis, a leading cause of death in industrialized countries, is directly related to the plasma concentration of low-density lipoprotein (LDL) cholesterol and inversely related to high-density lipoprotein (HDL) cholesterol levels. Although HDL particles directly protect the vascular wall, their beneficial effect is mostly attributed to their central functions in “reverse cholesterol transport” (RCT). This is a process in which

excess cholesterol from peripheral tissue and macrophages/foam cells is taken up and processed in HDL particles and later delivered to the liver, before being excreted in the bile as free cholesterol or after transformation into bile acids.¹ This process, the principal way by which the body eliminates cholesterol, relies on specific interactions between HDL particles and peripheral cells (cholesterol efflux) on the one hand and hepatocytes (HDL cholesterol uptake) on the other

Abbreviations: *abca1*, ATP-binding cassette, subfamily A, member 1; *abcb4*, ATP-binding cassette b4; *abcb11/bsep*, ATP-binding cassette b11/bile salt export pump; *abcg1*, ATP-binding cassette g1; *abcg5/abcg8*, ATP-binding cassette g5/g8; *apoA-I*, apolipoprotein A-I; ATP, adenosine triphosphate; HDL, high-density lipoprotein; *hmgcr*, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase; mRNA, messenger RNA; *ntcp*, Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide; *oatp*, organic anion transport polypeptide; P2Y₁₃, purinergic receptor P2Y, G-protein-coupled 13; RCT, reverse cholesterol transport; SR-BI, scavenger receptor class B, type I.

From the ¹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Unit 563, Toulouse, France; ²Université Toulouse III Paul-Sabatier, CHU de Toulouse, Toulouse, France; ³Institute of Interdisciplinary Research, Interdisciplinary Institute for Research in Human and Molecular Biology (IRIBHM), Université Libre de Bruxelles, Erasme Hospital, Brussels, Belgium; ⁴INSERM Unité Mixte de Recherche en Santé 939, Université Pierre et Marie Curie, Université Paris 06, Hôpital de la Pitié, Paris, France; ⁵Physiogenex SAS, Prologue Biotech, Labège, France; ⁶Department of Pediatrics, Center for Liver, Digestive and Metabolic Diseases, University Medical Center of Groningen, University of Groningen, Groningen, the Netherlands

Received May 24, 2010; accepted July 29, 2010.

*These authors contributed equally to this work.

This study was supported by the Avenir program of the French National Institute for Health and Medical Research. A.C.F. held a fellowship from FRM (Fondation pour la Recherche Médicale). U.J.F.T. is supported by the Netherlands Organization for Scientific Research (NWO) VIDI # 917-56-358.

hand. Hepatic HDL uptake can involve either the selective uptake of cholesteryl ester (CE) from HDL particles into hepatocytes (i.e., uptake of CE without HDL proteins) or holoparticle HDL endocytosis (i.e., uptake of both HDL protein and lipid moieties).

The scavenger receptor class B, type I (SR-BI) is a HDL receptor that mediates selective uptake *in vivo*. In SR-BI-deficient mice, HDL selective CE uptake by the liver decreases by more than 90% but HDL holoparticle uptake is unchanged, suggesting that holoparticle uptake does not involve SR-BI.^{2,3} A likely candidate mechanism mediating HDL holoparticle uptake in the absence of SR-BI is the cell-surface complex related to mitochondrial F₁-adenosine triphosphatase (ATPase), namely ecto-F₁-ATPase.⁴ When HDL binds to apolipoprotein A-I (apoA-I), this enzyme generates extracellular adenosine diphosphate (ADP) which then specifically activates the P2Y₁₃ receptor which is a G-protein-coupled receptor. This results in HDL holoparticle endocytosis mediated by as-yet unidentified low-affinity binding sites. In addition, cangrelor, which acts as a partial agonist of the P2Y₁₃ receptor, stimulates HDL endocytosis by human hepatocytes and perfused mouse liver.⁵

In this study, we generated P2Y₁₃-null mice (−/−) in order to investigate the potential contribution of P2Y₁₃ to RCT.

Materials and Method

For a detailed description of materials and methods used, please see Supporting Information.

Results

To investigate the role of P2Y₁₃ in cholesterol metabolism *in vivo*, we generated P2Y₁₃-null mice (−/−) by a gene-targeting strategy (Fig. 1) and their wild-type littermates (+/+) were used as controls. Physical examination of the (−/−) mice on a chow diet indicated that P2Y₁₃ deletion had no detrimental effect on development, fertility, or any hematological or biochemical parameters. Of note, we found no difference in plasma total cholesterol, HDL cholesterol, and triglyceride levels between the (+/+) and (−/−) mice maintained on chow diet (Table 1). Hepatic lipids were

also similar, except that free cholesterol content was significantly lower in (−/−) mice than in (+/+) mice (Table 1), suggesting that the hepatic cholesterol metabolism is impaired in mice lacking the P2Y₁₃ gene.

To examine HDL uptake mediated by P2Y₁₃, we allowed endocytosis of fluorescent DyLight⁵⁴⁹-HDL in primary hepatocytes isolated from P2Y₁₃ (−/−) and (+/+) mice. After 30 minutes of endocytosis, fluorescent DyLight⁵⁴⁹-HDL showed a punctate endosomal pattern in hepatocytes from (+/+) mice (Fig. 2A). In contrast, the staining was strikingly different in hepatocytes from P2Y₁₃ (−/−) mice, showing very few vesicular structures positive for fluorescent DyLight⁵⁴⁹-HDL (Fig. 2B), which suggests that receptor-mediated HDL uptake is markedly impaired when P2Y₁₃ is not expressed. We next compared the uptake of radiolabeled HDL by livers of P2Y₁₃ (−/−) and (+/+) mice. Hepatic uptake of ¹²⁵I-HDL was significantly lower in livers from P2Y₁₃ (−/−) mice compared to (+/+) (−20.3% ± 5.6%; Fig. 2C). Remarkably, the P2Y₁₃ partially agonistic compound cangrelor (10 μM) induced marked stimulation of ¹²⁵I-HDL hepatic uptake in livers from (+/+) mice (+34.9% ± 6.4% versus phosphate-buffered saline control) but had no effect in livers from P2Y₁₃ (−/−) mice (Fig. 2C). This confirms that cangrelor acts specifically via P2Y₁₃ activation and suggests that P2Y₁₃ can be activated *in vivo* to promote hepatic HDL uptake. Moreover, the stimulation of ¹²⁵I-HDL hepatic uptake by cangrelor was also observed in livers from mice with a targeted deletion of SR-BI in liver (hypomSR-BI-KO^{liver},⁶). The level of stimulation was the same as in P2Y₁₃ (+/+) mice (Fig. 2C), suggesting that the P2Y₁₃-mediated HDL uptake pathway is independent of SR-BI-mediated HDL selective CE uptake.

Because biliary sterols are supposedly derived mainly from HDL cholesterol,^{7,8} we next investigated whether the lower free cholesterol liver content in P2Y₁₃-KO mice would be translated into altered biliary lipid secretion rates (Table 1). Bile flow and bile acid secretion were somewhat lower following P2Y₁₃ inactivation. Biliary secretion of cholesterol and phospholipids were significantly lower in P2Y₁₃-KO mice compared to wild type controls (*P* < 0.05), indicating that hepatobiliary cholesterol transport is impaired in these mice. Conversely, cangrelor (8 nmol/kg) treatment

Address reprint requests to: Laurent O. Martinez, Ph.D., INSERM U563-CHU Purpan BP 3028, 31024 Toulouse Cedex 3, France. E-mail: laurent.martinez@inserm.fr; fax: +33 562 748 666.

Copyright © 2010 by the American Association for the Study of Liver Diseases.

View this article online at wileyonlinelibrary.com.

DOI 10.1002/hep.23897

Potential conflict of interest: Nothing to report.

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

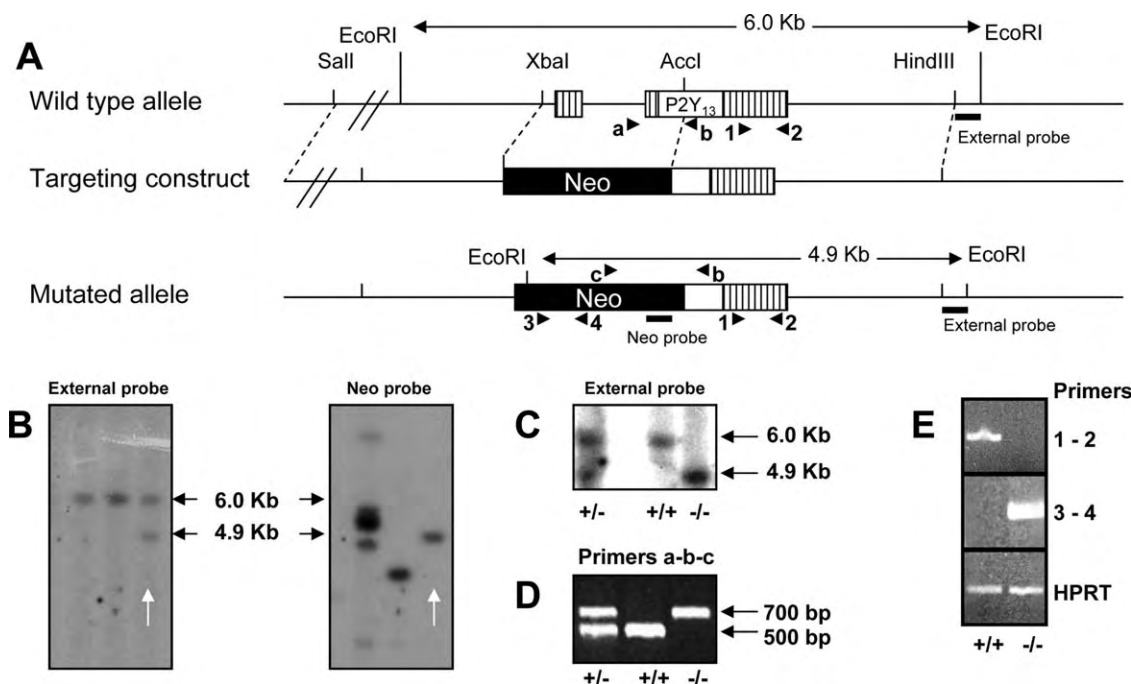


Fig. 1. Gene targeting strategy and characterization of P2Y₁₃-deficient mice. (A) Schematic representation of the genomic P2Y₁₃ locus, the targeting vector, and the mutated P2Y₁₃ allele. Boxes represent exons. The first noncoding exon and 182 base pairs of the second exon have been replaced by the neomycin resistance cassette in the mutated allele. (B) Screening of the targeted embryonic stem cell clones by Southern blotting. The white arrow highlights a positive clone. (C,D) Genotyping by (C) Southern blotting and (D) polymerase chain reaction (PCR) of litters obtained from P2Y₁₃ heterozygous breeding. (E) Characterization of the P2Y₁₃ mutant mice by PCR. Mice (P2Y₁₃-KO and control littermates) were tested for the expression in the liver of P2Y₁₃ mRNA (primers 1-2), Neo (primers 3-4), and hypoxanthine phosphoribosyl transferase (HPRT) transcript. Neo, neomycin (resistance cassette); Het, heterozygote; WT, wild-type; KO, knockout.

dramatically increased biliary total cholesterol, bile acid and phospholipid secretion together with bile flow in wild-type and hypomSR-BI-KO^{liver} mice but not in P2Y₁₃-KO mice (Fig. 3). In both wild-type and P2Y₁₃-KO mice, plasma lipid levels remained unchanged over 4 hours after cangrelor treatment (data not shown). This suggests that pharmacological activation of P2Y₁₃ might stimulate biliary lipid secretion *in vivo* with unchanged plasma lipid levels. This occurred independently of SR-BI, previously reported to mediate biliary cholesterol secretion, without concomitant changes in either biliary bile acid or phospholipid secretion.^{9,10}

To test the possibility that P2Y₁₃ is involved in RCT *in vivo*, [³H]cholesterol-loaded peritoneal macrophages from C57BL6/J mice were injected intraperitoneally in P2Y₁₃ (-/-) and (+/+) mice. The kinetics of [³H] counts in plasma were not significantly changed in P2Y₁₃ (-/-) mice versus (+/+) control mice (Fig. 4A). Likewise, there was no difference in [³H]cholesterol count in the liver at the end of the 48-hour period (Fig. 4B), which is consistent with most RCT experiments showing that the tracer amount recovered in the liver after 48 hours is essentially unchanged.¹¹ Nonetheless, absence of P2Y₁₃ resulted in a significant

reduction in overall macrophage-to-feces RCT, as reflected by lower counts in feces from both the bile acid and neutral sterol fractions (Fig. 4C).

Table 1. Plasma, Hepatic, and Biliary Lipid Values in Wild-Type and P2Y₁₃-KO Mice

	Wild-Type (+/+)	P2Y ₁₃ -KO (-/-)
Plasma (mg/dL)		
Total cholesterol	82 ± 12	79 ± 8
HDL cholesterol	63 ± 7	66 ± 10
Triglycerides	41 ± 12	41 ± 8
Liver (nmol/mg of tissue)		
Free cholesterol	6.01 ± 0.25	4.76 ± 0.31*
Cholesteryl ester	0.46 ± 0.05	0.49 ± 0.35
Triglycerides	7.74 ± 2.04	7.43 ± 2.02
Liver weight (% of body weight)	4.03 ± 0.11	3.84 ± 0.15
Biliary lipid		
Bile flow (μL/minute/100 g body weight)	5.70 ± 0.46	4.34 ± 0.67
Cholesterol secretion (nmol/min/100 g body weight)	2.60 ± 0.20	1.67 ± 0.21*
Bile acid secretion (nmol/minute/100 g body weight)	141 ± 23	94 ± 12
Phospholipid secretion (nmol/minute/100 g body weight)	15.41 ± 1.04	10.46 ± 1.12*

Blood samples were collected from mice fasted for 3 hours.

Values are expressed as means ± SEM; n ≥ 10 mice per group for plasma values and n ≥ 6 for liver and biliary lipid values.

*Indicates significant difference (P < 0.05) from wild-type (+/+) mice.

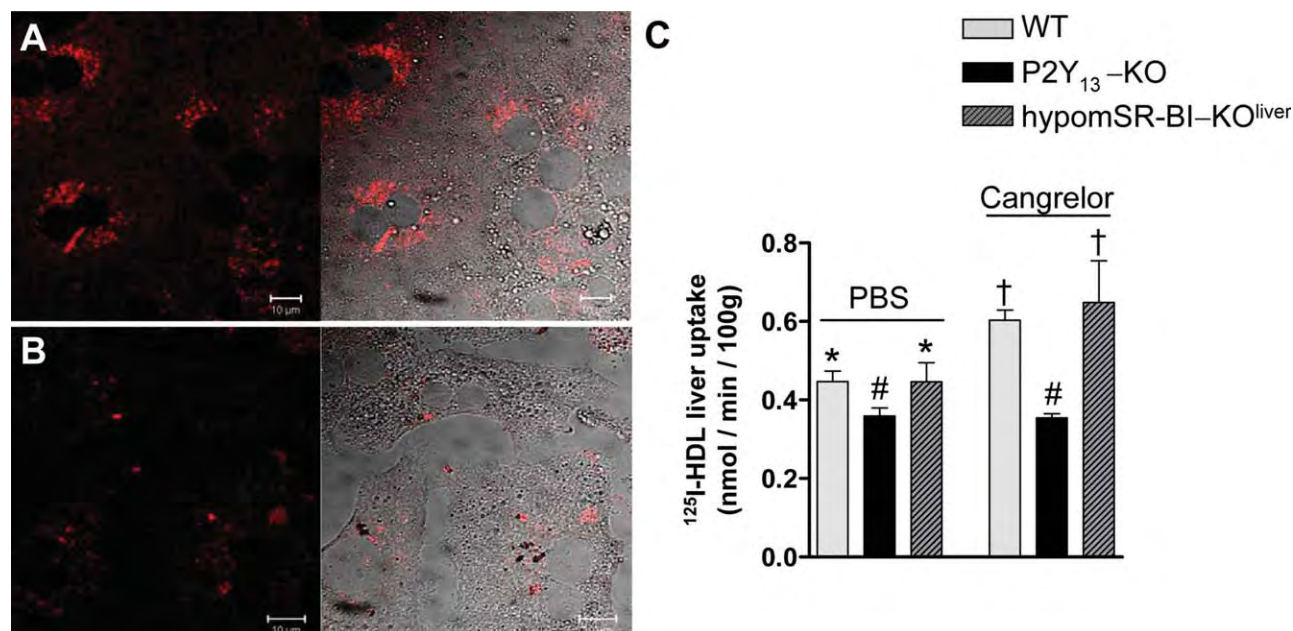


Fig. 2. Effect of P2Y₁₃ deletion on HDL uptake in murine liver. DyLight⁵⁴⁹-HDL uptake in primary hepatocytes from (A) wild-type or (B) P2Y₁₃-KO mice. Cells were incubated for 30 minutes at 37°C with 50 μ g/mL DyLight⁵⁴⁹-HDL then washed and processed for fluorescence microscopy as described in Materials and Methods. Right panels represent an overlap of DyLight⁵⁴⁹-HDL staining with the phase contrast image. (C) The ¹²⁵I-HDL uptake in liver from wild-type (WT), P2Y₁₃-KO, or hypomSR-BI-KO^{liver} mice. Mouse livers were perfused for 10 minutes at 37°C in phosphate-buffered saline (PBS) medium containing 50 μ g/mL ¹²⁵I-HDL with or without 10 μ M Cangrelor. Values are expressed as means \pm standard errors of the mean (SEM). $n = 5$ -6 mice for each group. $P < 0.05$ among *, #, and † groups for each measurement.

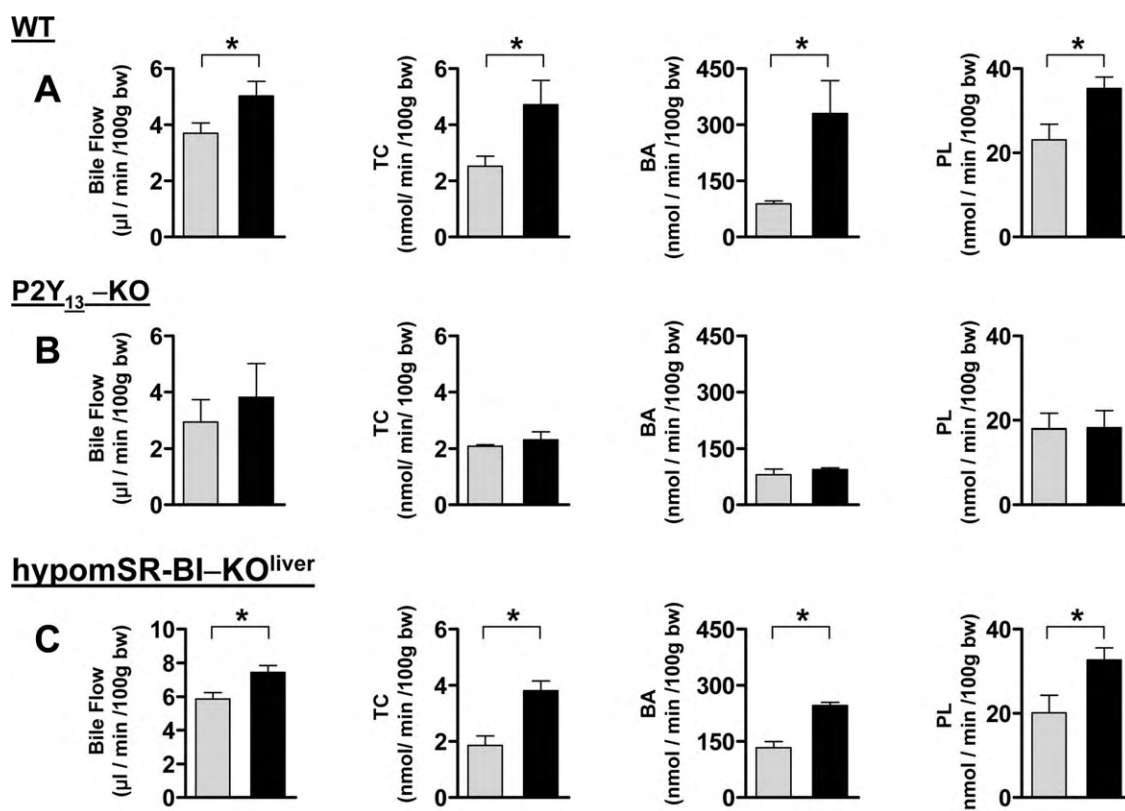


Fig. 3. Biliary lipid secretion rates in response to cangrelor treatment in (A) wild-type, (B) P2Y₁₃-KO, and (C) hypomSR-BI-KO^{liver} mice. The gallbladder was cannulated and mice were injected with cangrelor (8 nmol/kg body weight [bw], black bars) or PBS (gray bars). Then, the bile was collected for 210 minutes. Total cholesterol (TC), bile acid (BA), and phospholipids (PL) were determined as described in Materials and Methods. Values are expressed as means \pm SEM; $n = 6, 5$, and 4 mice for (A), (B), and (C), respectively. *Indicates significant difference ($P < 0.05$) between the cangrelor-treated animals and their corresponding controls.

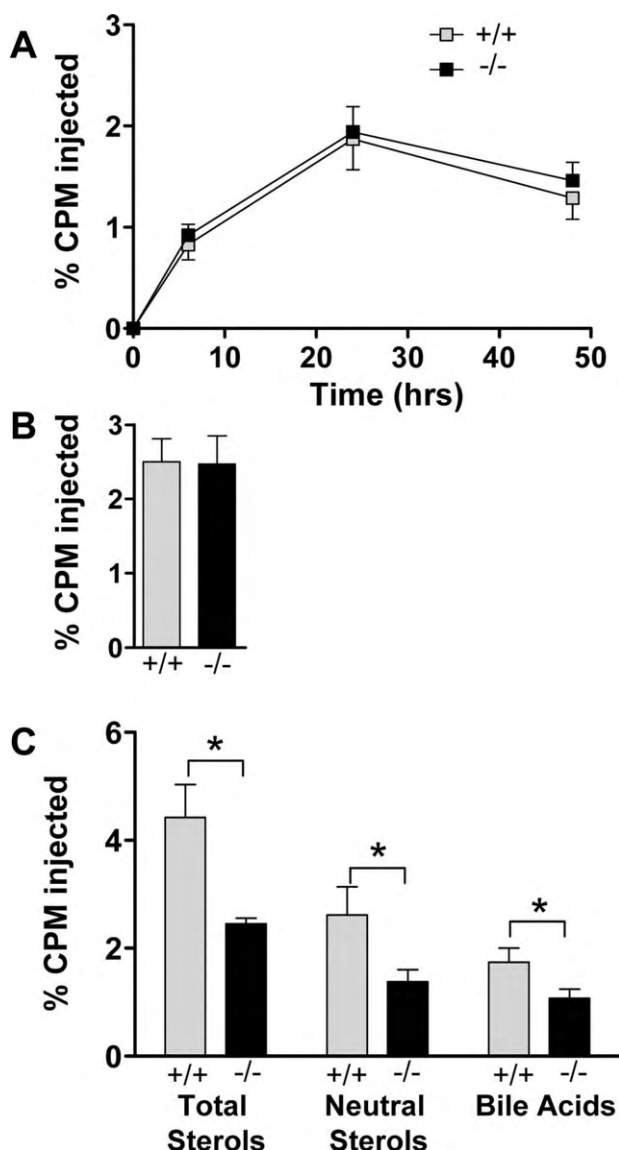


Fig. 4. Effect of P2Y₁₃ deletion on macrophage-to-feces RCT. Two millions [³H]cholesterol-loaded peritoneal macrophages from C57BL/6 mice were injected intraperitoneally in P2Y₁₃ (–/–) (black squares and bars) and (+/+) (gray squares and bars) mice. (A) Time course of [³H]cholesterol content in plasma. Mice were bled 6, 24, and 48 hours after injection with macrophages and counts per minute (CPM) in plasma were assessed directly by liquid scintillation. (B) Liver [³H]cholesterol content. At 48 hours after injection with macrophages, mice were killed, and a portion of liver was isolated for ³H-tracer analysis. (C) Fecal ³H-tracer distribution. After injection of macrophages, feces were collected continuously from 0 to 48 hours. Fecal bile acid and neutral sterol fractions were separated essentially as described in Materials and Methods and counts in the respective fractions were related to the total amount of feces produced over the whole experimental period. Data are expressed as a percentage of CPM injected \pm SEM; n = 6 mice per group. *P < 0.05 compared with +/+.

Hepatic expression of genes that are involved in cholesterol transport and metabolism was determined to assess potential changes due to P2Y₁₃ deletion (Table 2). Hepatic messenger RNA (mRNA) expression of

ATP-binding cassette transporters *abca1*, which plays a pivotal role in the efflux of cholesterol to apoA-I, and *abcg1*, which has a similar role in the efflux to HDL,^{12,13} were significantly lower in P2Y₁₃ (–/–) mice compared to (+/+) mice (Table 2; *abca1* –56% \pm 5% and *abcg1* –67% \pm 7%), suggesting that hepatic HDL biogenesis might be impaired in these mice. However, P2Y₁₃ deletion had no significant effect on the hepatic mRNA expression of biliary lipid transport proteins *abcg5/abcg8*, bile salt export pump (*abcb11/bsep*), sodium taurocholate cotransporting polypeptide (*ntcp*), and organic anion transport polypeptide (*oatp*). This suggests that the observed lower biliary lipid output in P2Y₁₃ (–/–) mice was not due to modulation of expression of these lipid transporters. The mRNA levels of the bile acid synthesis enzymes (cytochrome P450, family 7, subfamily A, polypeptide 1 [*cyp7a1*]; *cyp27a1*; and *cyp8b1*) were unchanged by P2Y₁₃ deficiency, indicating that the lower biliary cholesterol and phospholipid secretion observed in P2Y₁₃ (–/–) mice was not due to altered bile acid synthesis. SR-BI expression was also unaffected by the absence of P2Y₁₃ which, together with the fact that cangrelor still stimulates both hepatic HDL uptake and biliary lipid secretion in mice lacking hepatic SR-BI as in wild-type mice, support the idea of independent P2Y₁₃ and SR-BI-mediated HDL uptake pathways. No significant change was observed in the sterol regulatory element binding protein 2 target genes, low-density lipoprotein receptor, or 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A reductase mRNA levels in the liver of P2Y₁₃ (–/–) mice, suggesting that cholesterol derived from HDL and entering the liver via P2Y₁₃ is not accessible to the endoplasmic reticulum cholesterol pool which regulates hepatic cholesterol synthesis.¹⁴

Discussion

These data indicate that P2Y₁₃ activity is involved in macrophage-to-feces RCT. *In situ* liver perfusion and gallbladder cannulation experiments suggest that this occurs by promoting hepatic HDL uptake and biliary lipid secretion, independently of SR-BI-mediated HDL selective CE uptake. Surprisingly, although hallmark features of RCT are impaired in P2Y₁₃-deficient mice, these mice have unchanged HDL cholesterol levels compared to wild-type mice. Thus, the P2Y₁₃-dependent RCT pathway might contribute only minimally to the overall plasma HDL levels. In concordance with this observation, ABCA1 expression in macrophages does not seem to be a major contributing factor to plasma HDL levels although ABCA1

Table 2. Effect of P2Y₁₃ Deletion on Hepatic mRNA Expression of Genes Involved in Lipid Homeostasis

Gene Name	Fold-Change	Accession Number	Gene Title
atp5B	1.02 ± 0.04	NM_016774	ATP synthase, mitochondrial F1 complex, beta polypeptide
scarb1	0.90 ± 0.08	NM_016741	scavenger receptor class B, type 1
ldlr	0.78 ± 0.1	NM_010700	low density lipoprotein receptor
abca1	0.43 ± 0.05**	NM_013454	ATP-binding cassette, subfamily A, member 1
abcg1	0.31 ± 0.07**	NM_009593	ATP-binding cassette, subfamily G, member 1
apoa1	1.13 ± 0.09	NM_009692	Apolipoprotein A-I
cyp7a1	1.11 ± 0.11	NM_007824	cytochrome P450, family 7, subfamily A, polypeptide 1
cyp27a1	1.12 ± 0.09	NM_024264	cytochrome P450, family 27, subfamily A, polypeptide 1
cyp8b1	1.14 ± 0.08	NM_010012	cytochrome P450, family 8, subfamily B, polypeptide 1
abcg5	0.97 ± 0.16	NM_031884	ATP-binding cassette, subfamily G, member 5
abcg8	1.19 ± 0.09	NM_026180	ATP-binding cassette, subfamily G, member 8
abcb4/mdr2	0.75 ± 0.05	NM_021022	ATP-binding cassette, subfamily B (MDR/TAP), member 4
abcb11/bsep	1.06 ± 0.06	NM_021022	ATP-binding cassette, subfamily B (MDR/TAP), member 11
ntcp/slc10a1	0.82 ± 0.09	NM_011387	solute carrier family 10 (sodium/bile acid cotransporter family), member 1
oatp/slc1a1	0.89 ± 0.09	NM_013797	solute carrier organic anion transporter family, member 1A2
hmgcr	0.78 ± 0.12	NM_008255	3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase
srebp2	1.19 ± 0.09	NM_033218	sterol regulatory element binding transcription factor 2

Real-time PCR was performed on separate livers ($n \geq 8$) of 3-hour-fasted wild-type and P2Y₁₃-KO mice (males, 8-10 weeks old, chow diet). For all genes scored, the fold-change was calculated by dividing the KO value by the wild-type value (e.g., a drop of 60% from wild-type is reported as 0.40). Comparison of gene expression values between wild-type and P2Y₁₃-KO mice was done with the use of the Student *t* test (two-tailed). The threshold for fold-change was set above 1.5 or below 0.5 and ***P* < 0.01.

seems to contribute considerably to the efflux of excess cholesterol from these cells.¹⁵ An alternate idea is that compensatory processes might explain why plasma HDL levels are unaltered in P2Y₁₃-null mice. Most HDL contributed to the plasma pool is hepatic in origin, mainly through the lipidation of nascent apoA-I by ABCA1,^{12,16} the expression of which contributes up to approximately 70% to plasma HDL biogenesis *in vivo*. Recent studies also demonstrate that ABCG1, implicated in cholesterol efflux toward HDL, might also contribute to plasma HDL levels.¹³ A possibility is that circulating HDL levels in P2Y₁₃-null mice are unaffected, because the decreased HDL uptake is balanced by a decrease in hepatic HDL formation. On the one hand, HDL uptake and thereby catabolism is decreased in P2Y₁₃-null mice and, on the other hand, HDL formation in these mice might be lower as reflected by the decreased hepatic ABCA1 and ABCG1 expression. Although not formally tested, these findings are consistent with the overall concept of the role of hepatic ABCA1/ABCG1 in HDL formation.^{12,16} The phenotype observed in P2Y₁₃-null mice suggests that plasma HDL cholesterol may not always be the most reliable marker for assessing the potential utility of new therapeutic agents targeting HDL. It is thus important to develop effective approaches to evaluate HDL functionality. Our results show that pharmacological activation of P2Y₁₃ has the potential to raise biliary lipid secretion by enhancing hepatic HDL uptake. An interesting feature is that P2Y₁₃ activation not only drives biliary cholesterol secretion but also

the secretion of PL and bile acids, which suggest that pharmacological activation of P2Y₁₃ would not induce cholestasis. If P2Y₁₃ has similar activity in humans, it may become an attractive target for RCT promotion.

Acknowledgment: We thank the technical service of the animal (Genotoul Anexplo Platform) and lipidomic (Metatoul platform) facilities of the Bio-Medical Research Federative Institute of Toulouse (IFR150), Michel Nauze and Corinne Rolland for technical assistance, and Dr. Florence Bietrix (University of Amsterdam, the Netherlands) for support and guidance.

References

- Glomset JA, Norum KR. The metabolic role of lecithin: cholesterol acyltransferase: perspectives from pathology. *Adv Lipid Res* 1973;11:1-65.
- Brundert M, Ewert A, Heeren J, Behrendt B, Ramakrishnan R, Greten H, et al. Scavenger receptor class B type I mediates the selective uptake of high-density lipoprotein-associated cholesteryl ester by the liver in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:143-148.
- Nijstad N, Wiersma H, Gautier T, van der Giet M, Maugeais C, Tietge UJ. Scavenger receptor BI-mediated selective uptake is required for the remodeling of high density lipoprotein by endothelial lipase. *J Biol Chem* 2009;284:6093-6100.
- Martínez LO, Jacquet S, Esteve JP, Rolland C, Cabezon E, Champagne E, et al. Ectopic beta-chain of ATP synthase is an apolipoprotein A-I receptor in hepatic HDL endocytosis. *Nature* 2003;421:75-79.
- Jacquet S, Malaval C, Martínez LO, Sak K, Rolland C, Perez C, et al. The nucleotide receptor P2Y₁₃ is a key regulator of hepatic high-density lipoprotein (HDL) endocytosis. *Cell Mol Life Sci* 2005;62:2508-2515.
- Huby T, Doucet C, Dachet C, Ouzilleau B, Ueda Y, Afzal V, et al. Knockdown expression and hepatic deficiency reveal an atheroprotective role for SR-BI in liver and peripheral tissues. *J Clin Invest* 2006;116:2767-2776.

7. Portal I, Clerc T, Sbarra V, Portugal H, Pauli AM, Lafont H, et al. Importance of high-density lipoprotein-phosphatidylcholine in secretion of phospholipid and cholesterol in bile. *Am J Physiol* 1993;264:G1052-G1056.
8. Robins SJ, Fasulo JM. High density lipoproteins, but not other lipoproteins, provide a vehicle for sterol transport to bile. *J Clin Invest* 1997;99:380-384.
9. Mardones P, Quinones V, Amigo L, Moreno M, Miquel JF, Schwarz M, et al. Hepatic cholesterol and bile acid metabolism and intestinal cholesterol absorption in scavenger receptor class B type I-deficient mice. *J Lipid Res* 2001;42:170-180.
10. Wiersma H, Gatti A, Nijstad N, Oude Elferink RP, Kuipers F, Tietge UJ. Scavenger receptor class B type I mediates biliary cholesterol secretion independent of ATP-binding cassette transporter g5/g8 in mice. *HEPATOLOGY* 2009;50:1263-1272.
11. Naik SU, Wang X, Da Silva JS, Jaye M, Macphee CH, Reilly MP, et al. Pharmacological activation of liver X receptors promotes reverse cholesterol transport in vivo. *Circulation* 2006;113:90-97.
12. Timmins JM, Lee JY, Boudyguina E, Kluckman KD, Brunham LR, Mulya A, et al. Targeted inactivation of hepatic Abca1 causes profound hypoalphalipoproteinemia and kidney hypercatabolism of apoA-I. *J Clin Invest* 2005;115:1333-1342.
13. Wiersma H, Nijstad N, de Boer JF, Out R, Hogewerf W, Van Berkel TJ, et al. Lack of Abcg1 results in decreased plasma HDL cholesterol levels and increased biliary cholesterol secretion in mice fed a high cholesterol diet. *Atherosclerosis* 2009;206:141-147.
14. DeBose-Boyd RA. Feedback regulation of cholesterol synthesis: sterol-accelerated ubiquitination and degradation of HMG CoA reductase. *Cell Res* 2008;18:609-621.
15. Haghighpassand M, Bourassa PA, Francone OL, Aiello RJ. Monocyte/macrophage expression of ABCA1 has minimal contribution to plasma HDL levels. *J Clin Invest* 2001;108:1315-1320.
16. Basso F, Freeman L, Knapper CL, Remaley A, Stonik J, Neufeld EB, et al. Role of the hepatic ABCA1 transporter in modulating intrahepatic cholesterol and plasma HDL cholesterol concentrations. *J Lipid Res* 2003;44:296-302.

c. Conclusion :

Ce travail a ainsi permis de mettre en évidence, *in vivo*, le rôle physiologique important de la voie P2Y₁₃ dans la captation hépatique du cholestérol et des HDL. Les souris invalidées pour ce récepteur présentent en effet une diminution de la captation hépatique des holoparticules HDL, ainsi qu'une diminution du contenu hépatique en cholestérol et des sécrétions biliaires. Nous avons toutefois constaté que les taux plasmatiques de HDL restaient paradoxalement normaux. De façon intéressante, nous avons trouvé une diminution de l'expression hépatique des récepteurs *abca1* et *abcg1* ce qui pourrait suggérer une altération de la biogenèse des HDL chez ces souris, mécanisme potentiellement compensateur du déficit de captation. L'expression des transporteurs ABCA1 et ABCG1 qui participent à l'efflux du cholestérol cellulaire vers l'apoA-I et donc à la néo-formation des HDL au niveau hépatique est très finement régulée au niveau transcriptionnel *via* des récepteurs nucléaires (Oram & Heinecke, 2005). Ainsi, le récepteur nucléaire Liver X Receptor (LXR) s'hétérodimérise avec le Retinoid X Receptor (RXR) pour aller se fixer sur les éléments de réponse présents dans la région promotrice et le premier intron d'ABCA1. L'activation de chacun de ces récepteurs nucléaires passe par la liaison respective d'oxystérols (issu de la conversion du cholestérol par les cytochromes CYP450) sur le LXR et d'acide rétinoïque sur le RXR. Dans notre cas, il se pourrait donc que l'inactivation de P2Y₁₃ entraîne une diminution de l'endocytose des HDL engendrant ainsi un défaut d'activation du LXR secondaire à une diminution du cholestérol hépatocytaire ce qui a pour conséquence de diminuer l'expression d'ABCA1 et ABCG1. Cette hypothèse de régulation entre les mécanismes de captation et d'efflux du cholestérol-HDL permettrait d'expliquer le phénotype des animaux P2Y₁₃ knock-out, qui présentent un ralentissement de la clairance hépatique des HDL sans modification des quantités de HDL plasmatiques (figure 35).

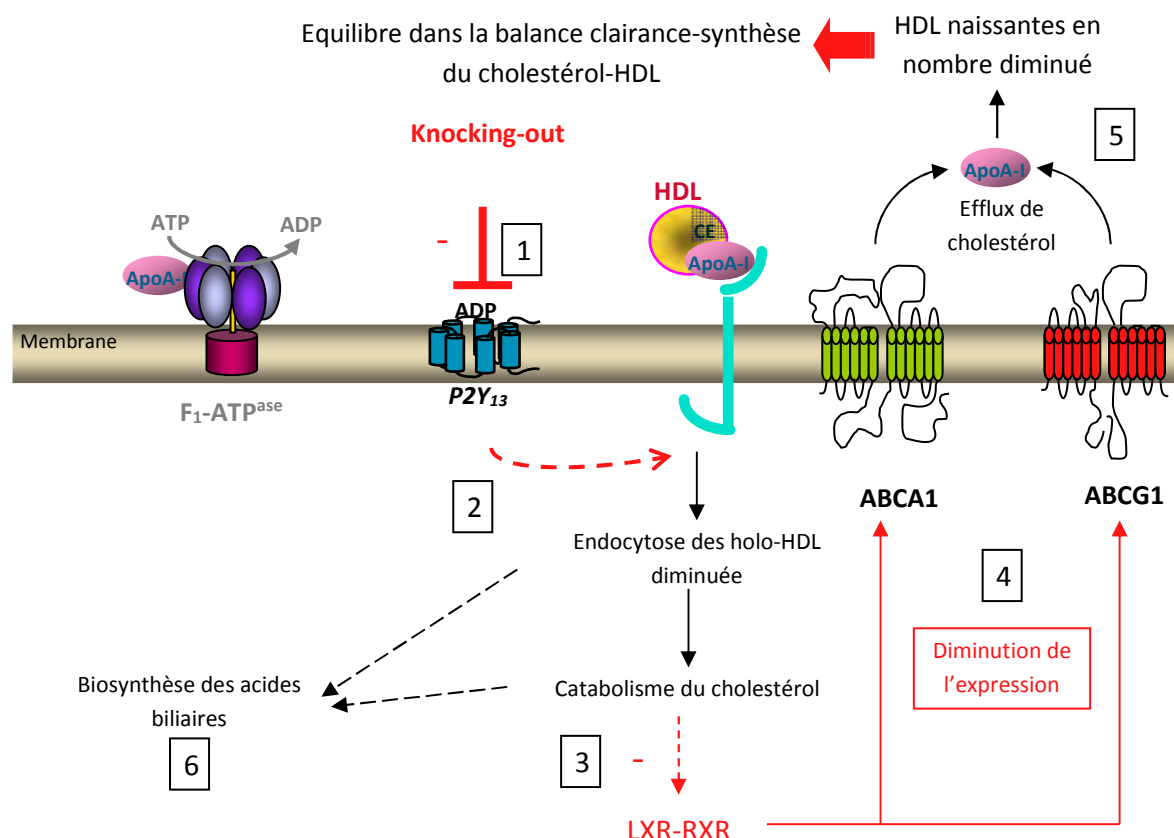


Figure 35 : Mécanisme possible de régulation de l'endocytose du cholestérol-HDL par la voie de la F₁-ATPase/P2Y₁₃ lors d'une inactivation de P2Y₁₃ par knocking-out. 1) inhibition du récepteur P2Y₁₃ 2) inhibition de l'endocytose des particules HDL entières. 3) la diminution du catabolisme du cholestérol est à la base d'une baisse d'activité de l'hétérodimère LXR-RXR. 4) la conséquence immédiate est une diminution de l'expression de 2 transporteurs d'efflux du cholestérol transmembranaires, ABCA1 et ABCG1. 5) il s'ensuit une diminution de synthèse des HDL naissantes ce qui concourt au maintien du taux de cholestérol-HDL plasmatique malgré un catabolisme général diminué. 6) l'invalidation du récepteur P2Y₁₃ s'accompagne d'une diminution des sécrétions biliaires. La stimulation du récepteur par le cangrelor s'accompagne à l'inverse d'une augmentation du flux biliaire ainsi que d'une augmentation de la sécrétion biliaire en cholestérol, phospholipides et en acides biliaires.

Pour confirmer cette hypothèse, des expériences d'efflux de cholestérol radiomarqué dans des cultures primaires d'hépatocytes de souris invalidées pour P2Y₁₃ ou dans des cultures de cellules HepG2 pourront alors être envisagées. Le dosage du 7 α -hydroxy-4-cholestèn-3-one (ou C4) nous permettra également d'évaluer l'effet de la modulation du récepteur P2Y₁₃ sur la synthèse biliaire. Il a en effet été montré que le C4, métabolite intermédiaire stable de la voie classique de biosynthèse des acides biliaires, pouvait être considéré comme un

biomarqueur plasmatique stable de la synthèse d'acides biliaires (Sauter, Berr, Beuers, Fischer, & Paumgartner, 1996).

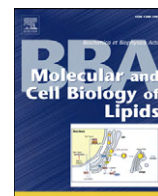
D) Effets de l'activation chronique du récepteur P2Y₁₃ :

a. Introduction :

Après avoir étudié l'effet d'une activation du récepteur P2Y₁₃ par injection *bolus* de cangrelor, nous avons décidé d'administrer sur trois jours cette molécule à des souris sauvages C57BL/6 afin de voir l'effet d'un traitement chronique sur le métabolisme du cholestérol. Étant donné le faible temps de demi-vie de cet agoniste partiel (moins de 10 minutes) (Storey, 2011), l'administration s'est effectuée à l'aide de pompes osmotiques infusant en continu la molécule.

Mon travail a consisté en une analyse de l'expression des gènes hépatiques par qPCR avec les mêmes méthodes que précédemment citées.

b. Article 3 :



Chronic pharmacological activation of P2Y₁₃ receptor in mice decreases HDL-cholesterol level by increasing hepatic HDL uptake and bile acid secretion



Nizar Serhan^{a,b}, Cendrine Cabou^{a,b,c,1}, Céline Verdier^{a,b,1}, Laetitia Lichtenstein^{a,b}, Nicole Malet^{a,b}, Bertrand Perret^{a,b}, Muriel Laffargue^{a,b}, Laurent O. Martinez^{a,b,*}

^a INSERM, UMR 1048, Institut de Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires, Toulouse, 31000, France

^b Université de Toulouse III, UMR 1048, Toulouse, 31300, France

^c Faculté de pharmacie, Toulouse, 31062, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 September 2012

Received in revised form 10 December 2012

Accepted 12 December 2012

Available online 20 December 2012

Keywords:

High density lipoprotein (HDL)

Purinergic receptor P2Y₁₃

ATP synthase

Reverse cholesterol transport (RCT)

ABSTRACT

High level of high-density lipoprotein cholesterol (HDL-cholesterol) is inversely correlated to the risk of atherosclerotic cardiovascular disease. The protective effect of HDL is mostly attributed to their metabolic functions in reverse cholesterol transport (RCT), a process whereby excess cell cholesterol is taken up from peripheral cells and processed in HDL particles, and is later delivered to the liver for further metabolism and bile excretion. We have previously demonstrated that P2Y₁₃ receptor is critical for RCT and that intravenous bolus injection of cangrelor (AR-C69931MX), a partial agonist of P2Y₁₃ receptor, can stimulate hepatic HDL uptake and subsequent lipid biliary secretion without any change in plasma lipid levels. In the present study, we investigated the effect of longer-term treatment with cangrelor on lipoprotein metabolism in mice. We observed that continuous delivery of cangrelor at a rate of 35 µg/day/kg body weight for 3 days markedly decreased plasma HDL-cholesterol level, by increasing the clearance of HDL particles by the liver. These effects were correlated to an increase in the rate of biliary bile acid secretion. An increased expression of SREBP-regulated genes of cholesterol metabolism was also observed without any change of hepatic lipid levels as compared to non-treated mice. Thus, 3-day cangrelor treatment markedly increases the flux of HDL-cholesterol from the plasma to the liver for bile acid secretion. Taken together our results suggest that P2Y₁₃ appears a promising target for therapeutic intervention aimed at preventing or reducing cardiovascular risk.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Epidemiological studies support a clear inverse association between levels of high-density lipoprotein cholesterol (HDL-cholesterol) and atherosclerotic cardiovascular disease [1]. HDL particles display anti-atherogenic effects on the vessel wall, partly by improving vascular functions and decreasing inflammation [2] but their main protective role is attributed to their central function in a process called reverse cholesterol transport (RCT). In this process, HDL removes excess cholesterol from peripheral cells (macrophages/foam cells) to deliver it to the liver where it is further eliminated into the bile as free cholesterol or after conversion into bile acids [3]. HDL-cholesterol uptake by the liver involves cell interactions between hepatocytes and HDL particles. So far, two receptors have been identified on hepatocytes: the scavenger receptor BI (SR-BI) is considered to mediate selective cholesterol uptake from

the HDL particle [4], whereas the membrane-associated ecto-F₁-ATPase binds apolipoprotein A-I (apoA-I, the major protein component of HDL) and contributes to the uptake of both protein and lipid moieties of the HDL particle, a process called holo-HDL endocytosis [5]. More precisely, the binding of apoA-I to the ecto-F₁-ATPase stimulates extracellular ATP hydrolysis into ADP. The generated extracellular ADP specifically activates the purinergic P2Y₁₃ receptor, a G-protein coupled receptor, under the control of the small GTPase RhoA and its effector, Rho kinase I (ROCK I) [6,7]. This results in cytoskeleton reorganization and subsequent holo-HDL endocytosis through low-affinity binding sites which remain to be identified [5]. Today, the development of therapeutic intervention targeting hepatic HDL uptake remains a challenge to reduce cardiovascular risk.

Cangrelor (AR-C69931MX) is a non-thienopyridine adenosine triphosphate analog, which reversibly antagonizes the P2Y₁₂ receptor, found mainly but not exclusively on the surface of blood platelets where it is involved in regulating blood clotting [8]. Because of its short plasma half life, being less than 10 min, this compound is used in clinical studies in the settings of percutaneous coronary intervention (PCI) and acute coronary syndromes as an antithrombotic therapy for

* Corresponding author at: INSERM U1048, Bât. L3, Hôpital Rangueil, BP 84225, 31432 Toulouse cedex 04, France. Tel.: +33 531 224 147; fax: +33 561 325 616.

E-mail address: Laurent.Martinez@inserm.fr (L.O. Martinez).

¹ Cendrine Cabou and Céline Verdier equally contributed to this work.

patients needing a rapid but reversible platelet inhibition [9]. Cangrelor acts also as a partial agonist of the P2Y₁₃ receptor as measured by its potential to reduce forskolin-induced cAMP levels in CHO cells stably expressing P2Y₁₃ [6]. On human hepatocytes, which naturally express P2Y₁₃ but not P2Y₁₂ receptor, cangrelor stimulated holo-HDL endocytosis [6]. This effect was replicated on perfused mouse liver from wild-type mice and was blunted in liver from P2Y₁₃-deficient mice [10]. Furthermore, an acute intravenous cangrelor injection stimulated biliary lipid secretions (both cholesterol and bile acid) in wild-type mice but this effect was not associated to any change in plasma cholesterol concentration [10]. As described in transgenic mice models, SR-BI is well characterized for its ability to mediate HDL-cholesterol flux from the peripheral cells to the liver [4,11], but the physiological importance of P2Y₁₃ at this level is not fully investigated.

The aim of the present study was to further evaluate the suitability of P2Y₁₃ as a target for therapeutic intervention targeting HDL metabolism. For that, we chronically infused cangrelor for 3-days in wild-type mice that were implanted subcutaneously with osmotic pumps.

2. Materials and methods

2.1. Materials

¹²⁵I-Na was obtained from GE-Healthcare. Cangrelor (Molecular mass: 774.95 g/mol), formerly denoted as AR-C69931MX, was provided by The Medicines Company (New Jersey, USA) and was used as previously described [10]. Hydrazine hydrate was from Acros. 3-Alpha-OH steroid dehydrogenase was from MP biochemicals. Phospholipase D was from ENZO. All other reagents (analytical grade) were from SIGMA.

2.2. Animals and diets

Eight week male C57B/L6 mice were used in this study. Mice were caged in animal rooms with alternating 12 h periods of light (07:00 am–7:00 pm) and dark (7:00 pm–07:00 am) and fed *ad libitum* with a normal mouse chow diet (# R04-10, SAFE, France). Since cangrelor has plasma half-life <10 min [12], osmotic pumps were used to insure a continuous delivery. Briefly, 100 µL osmotic pumps were filled with 70 µM cangrelor in PBS and were then implanted subcutaneously into the mice according to the manufacturer's instructions (Alzet®, model pump #1003D), to insure cangrelor release at an estimated rate of 0.5 µL/h, which corresponds to an estimated amount of delivery of 35 µg of cangrelor per kilogram of body weight per day (35 µg/kg BW/day). The dose was determined from the dose range currently used in clinical study [12] and was well tolerated by the mouse which shows any bleeding and no change in hemoglobin concentration at completion of the treatment. Pumps filled with PBS alone were also implanted into the group of control mice (referred as control mice). Lipid metabolism studies were performed after 3 days of treatment with cangrelor. All animal procedures were performed in accordance with the guidelines of the Committee on Animals of the Midi-Pyrénées Ethics Committee on Animal Experimentation and with the French Ministry of Agriculture license.

2.3. Plasma lipoprotein analyses

Plasma samples were collected from 3 h-fasted mice. Total cholesterol and total triglycerides were measured with commercial kits (CHOD-PAP for cholesterol and GPO-PAP for triglycerides; BIOLABO SA, Maizy, France). Quantification of plasma lipoproteins was performed using an Ultimate® 3000 HPLC system (Dionex, USA). 10 µL of plasma was injected and lipoproteins were separated on Superose® 6 10/300 GL columns (GE Healthcare, USA) with PBS at pH 7.4 as mobile phase at a 0.5 mL/min flow rate. The column effluent was split equally into 2 lines by a microsplitter 50:50, mixing with cholesterol and/or triglyceride reagents (Biolabo, France), thus achieving a simultaneous profile from

single injection. The two enzymatic reagents were each pumped at a rate of 0.1 mL/min using ISO-3100 analytical pumps (Dionex, USA). Both enzymatic reactions proceeded at 40 °C in a PTFE reactor coil (10 m×0.5 mm i.d.). Quantification was performed by measuring the percentage peak area of each lipoprotein (VLDL, LDL and HDL) and by multiplying each percentage to the total amount of cholesterol and/or triglycerides measured in plasma samples.

2.4. Hepatic lipid analyses

Following homogenization of liver samples in methanol/5 mM EGTA (2:1 v/v), lipids corresponding to an equivalent of 1 mg tissue were extracted in chloroform/methanol/water (2.5:2.5:2.1, v/v/v), in the presence of the internal standard: 3 µg of stigmaterol, 3 µg of cholesteryl heptadecanoate and 6 µg of glyceryl triheptadecanoate [13]. Neutral lipids were analyzed by gas–liquid chromatography on a FOCUS Thermo Electron system using Zebron-1 Phenomenex fused silica capillary columns (5 m×0.32 mm i.d., 0.50 mm film thickness). Oven temperature was programmed to ramp from 200 °C to 350 °C at 5 °C per min and the carrier gas was hydrogen (0.5 bar). The injector was held at 315 °C and the detector at 345 °C [14].

2.5. Measurement of HDL clearance and tissue uptake

HDL₃ were isolated by sequential flotation ultracentrifugation from the plasma of normolipidemic healthy human donors and depleted of apo E using heparin-sepharose chromatography as previously described [15]. Labeling of HDL₃ on the protein moiety with ¹²⁵I was performed by the N-bromosuccinimide method [15]. Eight week old mice (n≥6 per group) were fasted for 3 h before tracer injection then the mice were injected retro-orbitally with PBS medium (LONZA) containing 50 µg proteins/mouse of ¹²⁵I-HDL₃ (specific radioactivities ranged from 2000 cpm/ng of proteins). After injection, a blood sample was taken from the tail vein at different time points (5, 30, 60, 120, 180 and 240 min) for direct radioactivity measurement in serum. Mice were then anesthetized, abdomens were opened and a catheter was inserted into the vena porta. The inferior vena cava was cut and the mice were extensively perfused for 10 min with PBS at 4 °C. After perfusion, radioactivity associated with the liver, intestine and kidney of each mouse was counted harvested.

2.6. Measurement of LCAT activity

Plasma LCAT activity was assessed using a kit from Calbiochem (Merck Chemicals Limited, Nottingham, UK) and measured by taking the ratio of two emission intensities: 470 nm (which represents the intact substrate) and 390 nm (which represents the LCAT hydrolyzed monomer).

2.7. Measurement of hepatic VLDL production

Wild-type control and 3 day cangrelor treated mice were injected retroorbitally with 500 mg of Triton WR-1339 (Sigma) per kg body weight as a 15 g/dL solution in 0.9% NaCl after an overnight fast. Blood sample was taken from the tail vein at 0, 1, 2 and 3 h after Triton WR-1339 injection. Plasma triglycerides were analyzed enzymatically as described above and were related to the body mass of the animals. The hepatic VLDL production was calculated from the slope of the curve and expressed as g/h/kg of body weight.

2.8. Cannulation of the common bile duct and collection of hepatic bile

8 week old mice (n≥6 per group) were fasted for 3 h and were then anesthetized by intra-peritoneal injection of ketamine hydrochloride and xylazine hydrochloride. The common bile duct was ligated close to the duodenum; and then the gallbladder was punctured and cannulated

with a polyethylene-10 catheter. After 30 min, newly secreted bile was collected for 30 min by gallbladder cannulation. During bile collection, body temperature was stabilized using a temperature mattress. Bile flow ($\mu\text{L}/\text{min}/100\text{ g}$ of body weight) was determined gravimetrically assuming a density of 1 g/mL for bile.

2.9. Biliary lipid analyses

For bile acid analysis, 1 μL of bile samples was diluted with 99 μL of milliQ water then incubated with the work reagent (6 mg NAD, 0.5 M hydrazine hydrate buffer, 0.05 M Na-pyrophosphate) for 4 min. The mix was then incubated with a start reagent (0.03 M Tris-EDTA; 0.3 U/mL 3- α -OH steroid dehydrogenase) and measured for 30 min, under excitation of 340/330 nm and emission of 440/420 nm. For phospholipid analysis, 1 μL of bile samples was diluted with 49 μL of milliQ water then incubated with the work reagent (100 mM MOPS, pH 8; 0.55 mM HVA; 20 mM CaCl_2 ; 11 U/mL Phospholipase-D; 1.66 U/mL Peroxidase; 0.1% Triton X-100) for 4 min. The mix was then incubated with a start reagent (1 M MOPS, pH 8, 50 U/mL Choline oxidase) and measured for 67.5 min, under excitation of 340/330 and emission of 440/40. For cholesterol analysis, 1 μL of bile samples was diluted with 29 μL of milliQ water then was incubated with the work reagent (100 mM MOPS, pH 8, 0.25 mM HVA; 0.1% Triton X-100) for 4 min. The mix was then incubated with a start reagent (0.1 M MOPS, pH 8, 0.06 U/mL cholesterol oxidase, 0.15 U/mL cholesterol esterase, 0.45 U/mL Peroxidase, 0.06 mM Taurocholate) and measured for 45 min, under excitation of 340/330 nm and emission of 440/420 nm.

2.10. RNA isolation and quality control

After mechanical grinding, total RNA was extracted from each liver sample using the RNeasy® Mini Kit (Qiagen). Genomic DNA contamination was removed using RNase-free DNase set (Qiagen). The RNA was then eluted in DNase RNase-free water and finally the concentration of each sample was measured at a wavelength of 260 nm. The quality of the RNA was checked by capillary electrophoresis (Agilent® RNA Nano chip).

2.11. Reverse transcription

Reverse transcription of mRNA was performed using Superscript® III Reverse Transcriptase (Invitrogen) in the presence of primer p(dT) (Roche Diagnostics) and RNase OUT™ (Invitrogen). Briefly, 5 μg of total RNA from each sample was used with 2 μL of primer p(dT)₁₅ (20 $\mu\text{mol}/\text{L}$) and 0.5 μL of RNase OUT. After 8 min of incubation at 70 °C to inactivate DNase, 100 units of Superscript III Reverse Transcriptase (Invitrogen) were added and the mixture was incubated at 25 °C for 10 min and then at 50 °C for 1 h. The RT reaction was ended by heating the mixture at 95 °C for 5 min, it was then chilled and stored at $-80\text{ }^\circ\text{C}$ until use.

2.12. Analysis of gene expression by real-time quantitative PCR

Real-time quantitative PCR analysis was performed using SYBR Green I Master (Roche) on LightCycler® 480 Real-Time PCR System. Liver expression of each gene was studied and compared to the expression of the housekeeping gene hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase

(HPRT). PCR reactions were run in a 96-well format with 20 μL reaction mixture containing SYBR Green I Master (10 μL), cDNA from the RT reaction (5 μg , 4 μL) and gene specific primers (100–900 nM, 6 μL). Reactions were run with a standard 2-step cycling program, 95 °C for 10 s and 60 °C for 40 s, for 40 cycles. Each analysis included both housekeeping gene and gene of interest, primer/probe pairs as multiplexed samples. mRNA expression levels presented (6–8 mice per group) were calculated relative to the average of the housekeeping gene HPRT and further normalized to the relative expression level of the respective controls, i.e. wild-type non-treated (PBS) mice. The specific primers used are reported in Supplementary Table 1.

2.13. Statistical analysis

All results are presented as means \pm SEM. Comparison between groups were made using the Mann–Whitney test for independent samples. Outcomes of $p < 0.05$ were considered to be significant. Analyses were performed using GraphPad Prism 6 software.

3. Results

3.1. Cangrelor treatment decreases HDL levels in mice

Male C57B/L6 mice have been subcutaneously infused for 3 days with cangrelor, a compound that had previously been characterized as a partial agonist of P2Y₁₃ [6] (see [Materials and methods](#)). At the end of the 3-day infusion period, we measured plasma total cholesterol (TC) and triglyceride (TG) concentrations in the plasma of 3 h fasted mice. As shown in [Table 1](#), plasma total cholesterol concentration was significantly lower in cangrelor-treated group as compared to non-treated control group (54.0 ± 2.8 versus 67.4 ± 5.0 mg/dL respectively, $p < 0.05$). Interestingly, this lowering was associated with a significant decrease in free cholesterol ([Table 1](#)) whereas a slight but not significant decrease was observed in esterified cholesterol (not shown). Plasma TG concentrations were not statistically different between the two groups. Given that plasma lipid concentration gives no information on lipid content in lipoprotein particles, we subjected the plasma of these mice to size exclusion chromatography and quantified cholesterol and TG levels in each class of lipoproteins (HDL, LDL and VLDL). Analysis of plasma lipoprotein cholesterol profiles show that changes in plasma cholesterol levels reflected a marked decrease in the amount of total cholesterol associated with HDL particles and to a lesser extent with VLDL particles ([Table 2](#), $p < 0.05$). Of note, this decrease in total cholesterol content in these two lipoprotein classes was mainly reflected by a decrease in their free cholesterol (FC) content ([Table 2](#), $p < 0.05$), although a slight but not significant decrease was also observed in esterified cholesterol (EC) transported by HDL and VLDL ($p = 0.09$ and $p = 0.06$ respectively, [Table 2](#)). With respect to HDL, this effect could be attributed to a $\sim 25\%$ increase in LCAT activity in plasma from cangrelor treated mice ([Fig. 1A](#)). Indeed, the activity of this enzyme that catalyses the esterification of free cholesterol [16], may contribute to maintain EC content in HDL despite the observed decrease in TC. Interestingly, cangrelor also induced a significant increase in HDL TG content ([Table 2](#), $p < 0.05$). Noteworthy that the TG content remained unaltered in LDL and VLDL particles ([Table 2](#)), explaining why no change of total plasma TG levels was observed under cangrelor treatment ([Table 1](#)) since these two classes of lipoproteins are quantitatively the main contributors of plasma TG. Concordant with the enrichment of

Table 1
Plasma lipid levels in cangrelor treated mice.

Cangrelor	TC (mg/dl)		FC (mg/dl)		TG (mg/dl)	
	–	+	–	+	–	+
Total plasma	67.4 ± 5.0	$54.0 \pm 2.8^*$	29.5 ± 2.5	$21.4 \pm 1.2^*$	32.6 ± 7.8	36.9 ± 4.1

Total cholesterol (TC), free cholesterol (FC) and triglycerides (TG) were measured on mice treated (+) or not (–) with cangrelor for 3 days as described in [Material and methods](#). Data represent mean \pm SEM, $n \geq 6$ per group. * $p < 0.05$ versus non-treated mice.

Table 2
Plasma lipoprotein composition in cangrelor treated mice.

Cangrelor	VLDL (mg/dl)		LDL (mg/dl)		HDL (mg/dl)	
	–	+	–	+	–	+
TC	4.95 ± 0.72	2.83 ± 0.25*	8.24 ± 0.42	7.70 ± 0.76	54.25 ± 4.03	43.49 ± 2.10*
FC	3.37 ± 0.51	1.76 ± 0.16*	3.85 ± 0.24	3.54 ± 0.28	22.32 ± 1.95	16.13 ± 0.84*
EC	1.57 ± 0.22	1.06 ± 0.14	4.39 ± 0.27	4.15 ± 0.49	31.93 ± 2.19	27.35 ± 1.38
TG	14.6 ± 4.7	16.7 ± 2.5	12.9 ± 2.2	13.1 ± 1.7	4.0 ± 0.8	7.0 ± 0.7*

Total cholesterol (TC), free cholesterol (FC), esterified cholesterol (EC) and triglycerides (TG) were measured on mice treated (+) or not (–) with cangrelor for 3 days as described in [Materials and methods](#).

Data represent mean ± SEM, n ≥ 6 per group. *p < 0.05 versus non-treated (–) mice.

TG content only in HDL, the mean size of serum HDL particles is slightly increased under cangrelor treatment, as detected with a slight left-shift of HDL particles on lipoprotein profile obtained by fast protein liquid chromatography (FPLC); conversely, the size of VLDL and LDL particles remained unchanged ([Fig. 2](#)).

3.2. Cangrelor increases HDL clearance from the circulation and HDL hepatic uptake

To gain more insight into the mechanisms by which cangrelor decreases plasma HDL-cholesterol levels, ¹²⁵I-HDL₃ (a subclass of HDL radiolabeled on the apolipoprotein moiety) was retro-orbitally injected to mice treated with cangrelor or PBS (control) for 3 days. Radioactivity in serum, which reflects HDL clearance, was measured at different time points during 4 h following the injection. Radioactivity within liver, intestine and kidney, indicating HDL tissue uptake, was measured at the end of the 4 h experimentation. As reported in [Fig. 3A](#), cangrelor treatment significantly increased serum HDL clearance as compared to control mice. At the end of the 4 h experimentation period, HDL clearance from the circulation was significantly increased upon cangrelor treatment, up to 52.2 ± 1.4% of the injected dose (ID) as compared to 37.8 ± 1.6% in control animals, representing a relative 20% increase in the clearance rate (p < 0.02, [Fig. 3A](#)). Regarding HDL uptake by tissues, cangrelor treated mice showed a 2.7-fold increase of the radioactivity found in the liver (25.3 ± 1.3% versus 9.1 ± 1.6% of the ID in cangrelor treated and control mice respectively, p < 0.005, [Fig. 3B](#)), indicating that cangrelor treatment significantly stimulates hepatic HDL uptake. No difference between cangrelor-treated and control groups was observed in the percent ID recovered in other organs that actively catabolyze HDL, such as intestine ([Fig. 3C](#)) and kidney ([Fig. 3D](#)). Thus, the stimulatory effect of cangrelor on HDL clearance from the circulation can be attributed to an increase of HDL uptake by the liver. Regarding the effect of cangrelor on non-HDL-cholesterol levels, the observed reduction of cholesterol content in VLDL ([Table 2](#)) was not the result of an impaired hepatic VLDL production ([Fig. 1B](#)).

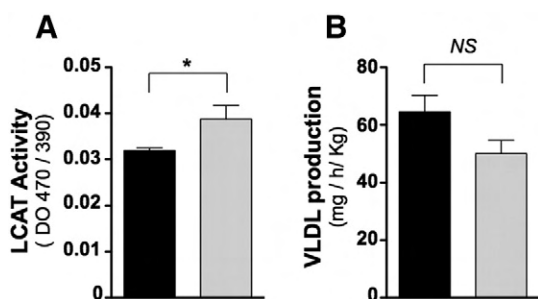


Fig. 1. LCAT activity and VLDL production in wild-type mice in response to treatment with cangrelor. LCAT activity (A) and VLDL production rate (B) was determined in 8–10 week old male animals treated (gray box) or not (black box) with cangrelor for 3 days. LCAT activity was determined by taking the ratio of emission intensities between 470 nm (which represents the intact substrate) and 390 nm (which represents the LCAT hydrolyzed monomer). VLDL production was determined by calculating the accumulation rate (g/h/kg body weight) of triglycerides in the plasma after blocking VLDL clearance by Triton WR-1339. Data are expressed as mean ± SEM (n ≥ 4/group; *p < 0.02; NS = not significant p-value; Mann–Whitney test).

3.3. Cangrelor treatment increased bile acid secretion into bile

Next, we analyzed whether the increase in hepatic HDL uptake induced by cangrelor treatment ([Fig. 2B](#)) translates into increase in hepatic lipid contents and biliary lipid secretions. Surprisingly, no significant difference was found in the level of hepatic cholesterol (free and esterified) and triglycerides between cangrelor-treated and control mice ([Table 3](#)). To assess a potential effect of cangrelor treatment on biliary lipid secretion, hepatic bile was collected for 30 min following cannulation of the gallbladder. Unexpectedly, cangrelor treatment did not change bile flow and biliary secretion rate of cholesterol and phospholipids ([Table 3](#)). However, bile acid secretion was significantly higher in cangrelor treated mice ([Table 3](#)), indicating that cangrelor treatment increases bile secretion of lipid but only as bile acids.

3.4. Hepatic mRNA analysis

Hepatic expression of genes involved in cholesterol transport and metabolism was determined to assess potential changes due to P2Y₁₃ activation by cangrelor. As reported in [Table 4](#), no difference was found under cangrelor treatment in the mRNA expression levels of genes involved in hepatic HDL uptake, such as SR-BI (scrab1), P2Y₁₃ (p2y13) and β-chain of F₁-ATPase (atp5b). In addition, no significant difference was observed in the mRNA expression levels of genes involved in cholesterol efflux towards the blood or the bile, such as ABCA1 (abca1), ABCG1 (abcg1) and ABCG5/G8 (abcg5/g8). These observations show that cangrelor does not affect gene expression level of proteins involved in HDL-mediated hepatic cholesterol fluxes. Moreover, hepatic mRNA expression of enzymes catalyzing key steps in bile acid synthesis (cyp7a1, cyp27a1 and cyp8b1), or transporters controlling hepatic bile acid fluxes (abcb11/bsep, ntcp, oatp) remained unchanged under cangrelor treatment. In contrast, cangrelor significantly increased hepatic mRNA expression level of two enzymes involved in cholesterol neosynthesis, HMG-CoA reductase and synthase (hmgcr and hmgs), by about 75 and 110% respectively (each p < 0.005, [Table 4](#)). It also increases hepatic gene expression of SREBP2 and LDL receptor (ldlr) by more than 50% and 90% respectively (each p < 0.005, [Table 4](#)). Taken together these data indicate that cangrelor treatment increases SREBP2 target genes

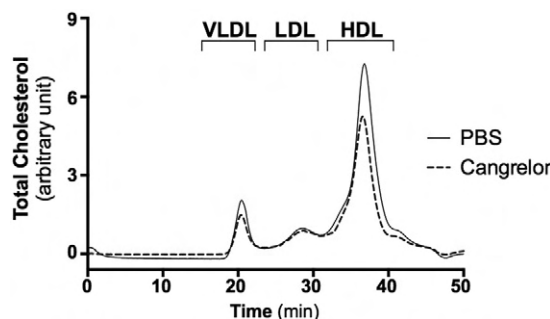


Fig. 2. FPLC profiles of representative plasma samples. Dashed line is representative of plasma from one mouse treated with cangrelor for 3 days; plain line is representative of plasma from one control mouse (PBS-treated).

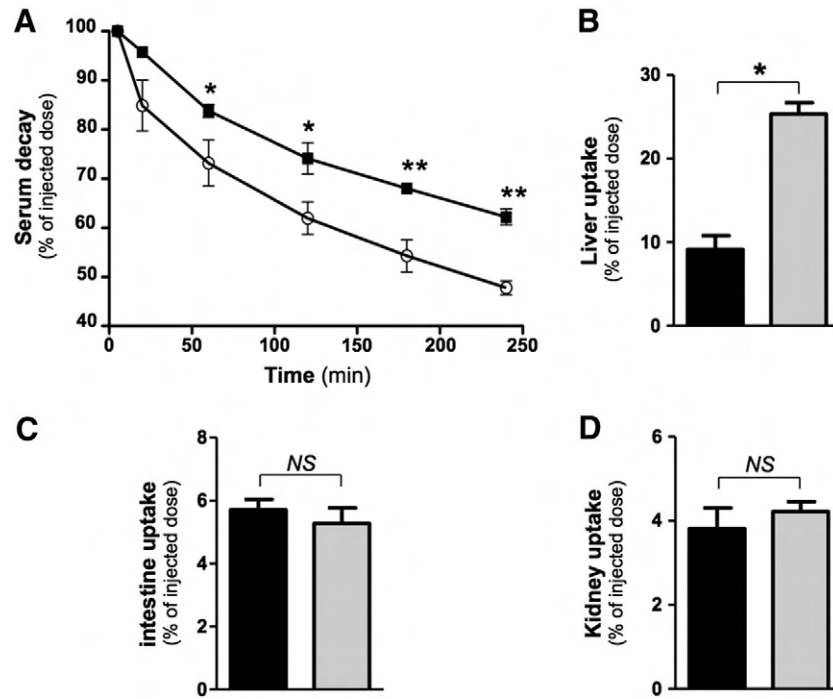


Fig. 3. Kinetics of ^{125}I -HDL₃ in wild-type mice in response to treatment with cangrelor. (A) Values are the fraction of the injected dose remaining in plasma of mice treated by cangrelor (open circle) or vehicle (PBS, black squares). Data are given as mean \pm S.D.; $n=4$ mice/group; Uptake by the liver (B), intestine (C) and kidney (D) in mice treated by cangrelor (gray box) or vehicle (PBS, black box). Values are expressed as the percentage of remaining radioactivity in tissue after 240 min. Stars indicates a significant difference from control mice (* $p<0.02$; ** $p<0.005$; NS = not significant p -value; Mann–Whitney test).

involved in cholesterol synthesis or metabolism, suggesting that mice have adjusted their mRNA expression to accommodate the metabolic change induced by cangrelor treatment.

4. Discussion

Cangrelor is a non-thienopyridine ATP analog, originally developed as a purinergic G protein coupled receptor P2Y₁₂ antagonist [12], that we have previously described as a partial agonist of P2Y₁₃ receptor, as measured by its potential to lower forskolin-induced cAMP levels in P2Y₁₃ CHO transfected cells [6]. Furthermore, our earlier *in vivo* results demonstrated the agonist specificity of cangrelor towards P2Y₁₃ receptor and its function in HDL metabolism. Indeed, we previously reported that bolus administration of cangrelor could stimulate HDL uptake and biliary lipid secretions by the liver in wild type but not in P2Y₁₃ knockout mice suggesting that cangrelor acts *in vivo* to promote HDL-mediated hepatobiliary secretions, specifically through its agonist action on P2Y₁₃ receptor [10].

In this study, we further evaluated the suitability of P2Y₁₃ as a target for therapeutic intervention targeting HDL metabolism by administering

cangrelor to wild type mice on a longer period of time. Due to the short plasma half-life of cangrelor, being less than 10 min [12], subcutaneous continuous administration by the use of an osmotic pump was chosen. Our findings indicate that 3-day continuous delivery of cangrelor at a rate of 35 $\mu\text{g/kg}$ body weight/day markedly increased the clearance of HDL particles from the circulation by the liver and decreased plasma HDL-cholesterol level. These effects were correlated to an increase in the rate of biliary bile acid secretion.

The effect of 3-day cangrelor treatment in decreasing HDL-cholesterol level is not entirely unexpected as it might be attributed to its action in stimulating HDL uptake by the liver, resulting in an accelerated HDL clearance from the circulation. Indeed, the impact of hepatic HDL uptake on plasma HDL-cholesterol level has been previously reported *in vivo*. For instance, transgenic or adenovirus-transduced mice overexpressing the HDL receptor SR-BI in the liver also display a decrease of HDL-cholesterol level due to an increase of hepatic HDL-cholesterol uptake [17,18]. Of note, in the present study, we can rule out any effect of cangrelor on SR-BI activity since i) hepatic expression of mRNA SR-BI was unchanged under cangrelor treatment, and ii) plasma HDL clearance and tissue uptake were measured using apoE-free HDL₃ particles labeled on the protein moiety with ^{125}I , which is internalized independently of SR-BI-mediated selective uptake of HDL cholesteryl ester [19–21]. Furthermore, although SR-BI could also contribute to HDL retroendocytosis *i.e.* uptake of the holo-HDL particle followed by resecretion of the protein moiety [22], we previously reported that bolus administration of cangrelor could stimulate hepatic uptake of ^{125}I -HDL₃ on mice with targeted deletion of SR-BI in the liver to the same level than wild type mice, thus demonstrating that cangrelor acts independently of SR-BI [10].

Interestingly, besides decreasing HDL-cholesterol level, cangrelor treatment also modifies HDL composition, with a decrease in its free cholesterol content and an increase in TG content. This increase in the core-surface lipid ratio would indicate the presence of larger HDL particles, which is supported by the FPLC data. This change in HDL composition could be attributed to the possible ability of cangrelor to stimulate the holoparticle uptake of some specific subclasses of HDL particles,

Table 3

Hepatic and biliary lipid values in wild type mice receiving either PBS (control) or cangrelor.

	Control	Cangrelor
<i>Liver (nmol/mg of tissue):</i>		
Free cholesterol	4.96 \pm 0.17	5.25 \pm 0.23
Cholesteryl ester	0.47 \pm 0.07	0.41 \pm 0.04
Triglycerides	3.19 \pm 0.25	2.80 \pm 0.45
<i>Biliary lipid:</i>		
Bile flow ($\mu\text{L}/\text{min}/100$ g BW)	3.96 \pm 0.48	4.08 \pm 0.28
Cholesterol secretion (nmol/min/100 g BW)	3.10 \pm 0.26	3.19 \pm 0.38
Bile acid secretion (nmol/min/100 g BW)	216 \pm 12.6	308.2 \pm 15.3*
Phospholipid secretion (nmol/min/100 g BW)	18.45 \pm 3.09	26.67 \pm 2.86

Values are expressed as means \pm SEM; $n=6$ mice per group.

* Indicates significant difference ($p<0.05$) from control mice.

Table 4

Hepatic gene expression levels in response to cangrelor treatment. Real-time PCR was performed on separate livers of 3 h fasted mice treated or not with cangrelor (n = 6–8 males mice per group, 8–10 weeks old, chow diet). For all genes scored, mRNA expression levels were calculated relative to the average of the housekeeping gene HPRT and further normalized to the relative expression level of the respective controls, i.e. wild-type non-treated (PBS) mice.

Gene	Accession no.	Control	Cangrelor	Gene title
p2y13	NM_028808	1.00 ± 0.18	1.25 ± 0.39	P2Y purinoreceptor 13
atp5b	NM_016774	1.00 ± 0.12	0.90 ± 0.09	ATP synthase, H + transporting, mitochondrial F1 complex, beta polypeptide
scarb1	NM_016741	1.00 ± 0.15	1.04 ± 0.14	Scavenger receptor class B, member 1
ldlr	NM_010700	1.00 ± 0.20	1.91 ± 0.23*	Low density lipoprotein receptor
abca1	NM_013454	1.00 ± 0.10	1.28 ± 0.22	ATP-binding cassette, sub-family A, member 1
abcg1	NM_009593	1.00 ± 0.14	1.14 ± 0.18	ATP-binding cassette, sub-family G, member 1
apoa1	NM_009692	1.00 ± 0.13	0.80 ± 0.06	Apolipoprotein A-I
cyp7a1	NM_007824	1.00 ± 0.10	1.09 ± 0.12	Cytochrome P450, family 27, subfamily A, polypeptide 1
cyp27a1	NM_024264	1.00 ± 0.23	1.05 ± 0.16	Cytochrome P450, family 8, subfamily B, polypeptide 1
cyp8b1	NM_010012	1.00 ± 0.35	0.85 ± 0.16	Cytochrome P450, family 8, subfamily B, polypeptide 1
abcg5	NM_031884	1.00 ± 0.34	0.59 ± 0.14	ATP-binding cassette, sub-family G, member 5
abcg8	NM_026180	1.00 ± 0.23	1.19 ± 0.10	ATP-binding cassette, sub-family G, member 8
abcb11/bsep	NM_021022	1.00 ± 0.11	1.12 ± 0.08	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 11
ntcp/slc10a1	NM_011387	1.00 ± 0.14	1.08 ± 0.08	Solute carrier family 10 (sodium/bile acid cotransporter family), member 1
oatp/slc10a1	NM_013797	1.00 ± 0.13	0.98 ± 0.13	Solute carrier organic anion transporter family, member 1A2
hmgcr	NM_008255	1.00 ± 0.12	1.76 ± 0.40*	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase
hmgcs	NM_145942.4	1.00 ± 0.19	2.13 ± 0.43*	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase
srebp2	NM_033218	1.00 ± 0.11	1.50 ± 0.17*	Sterol regulatory element binding transcription factor 2
acat1	NM_144784	1.00 ± 0.04	1.04 ± 0.08	Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1
acat2	NM_146064	1.00 ± 0.10	1.05 ± 0.13	Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 2
lcat	NM_008490	1.00 ± 0.06	1.09 ± 0.10	Lecithin cholesterol acyltransferase

Values are expressed as means ± SEM.

* Indicates significant difference (p < 0.05) from control mice.

resulting in a change in the composition of the remaining circulating HDL. However, an action of cangrelor solely on holo-HDL uptake would have altered free and esterified cholesterol content equally. In this context, the unchanged level of esterified cholesterol in HDL could be explained by the increase of plasma LCAT activity under cangrelor treatment. The mechanism by which LCAT activity is increased and how this could potentially modulate HDL metabolism as well as cholesterol flux would require further investigation. Alternatively, we cannot rule out an effect of cangrelor on the synthesis of *de-novo* HDL by the liver and/or the intestine that would translate into a change in the composition of plasma HDL. Regarding non-HDL lipoproteins, cangrelor has no effect on LDL, the composition of which being similar in treated and control mice and, beside a slight decrease observed under cangrelor treatment in VLDL cholesterol content, VLDL TG content and hepatic VLDL production remain unchanged, suggesting that in those experimental conditions cangrelor mainly acts on HDL metabolism.

Our data show that cangrelor treatment significantly increases biliary secretion of bile acid (BA) in the absence of mass changes in hepatic lipid composition. Of note, the observed increase in BA biliary secretion under cangrelor treatment does not seem to be related to an increase in the expression level of key enzymes involved in BA synthesis (cyp7a1, cyp27a1 and cyp8b1) or transporters controlling hepatic bile acid fluxes (abcb11/bsep, ntcp and oatp). Thus, it is likely an upregulation of these enzymes and transporters is not required to handle the cangrelor-mediated biliary BA secretion. However, we cannot exclude that protein level and/or activity of these enzymes and transporters are increasing under cangrelor treatment and thus further investigation is required to more precisely determine the mechanism by which cangrelor stimulates biliary BA secretion. An interesting feature is that cangrelor increases hepatic expression levels of srebp2 and its target genes HmgCoA reductase, HmgCoA synthase as well as the LDL receptor, which are considered as sensitive sensor for ER cholesterol content [23]. Thus, P2Y₁₃-mediated HDL uptake by the liver seems to drive cholesterol into pathway that serve for BA production and secretion into the bile and to redistribute intracellular cholesterol away from regulating pool in the ER without increasing hepatic cholesterol storage. The determination of the origin of cholesterol that serves for BA will require further investigations but we can hypothesize that it could be either cholesterol derived from HDL

internalized by P2Y₁₃ pathway or cholesterol derived from ER cholesterol pool.

Furthermore, the cholesterol derived from HDL that has been internalized by the P2Y₁₃ pathway is likely to use a distinct pathway of intracellular trafficking than the one internalized through SR-BI. Indeed, overexpression of SR-BI by recombinant adenovirus approaches resulted in an increase in liver cholesterol content correlated to an increase in biliary cholesterol secretion without any change in BA secretion rates [24,25].

Our present results show some similarities with our previous data obtained with bolus administration of cangrelor, such as the ability of cangrelor to stimulate hepatic HDL uptake [10]. However, we can appreciate some differences between the two experimental conditions i.e. bolus administration versus continuous delivery of cangrelor. For instance bolus injection did not modify HDL-cholesterol levels, which is decreasing under continuous delivery. This indicates that, when injected in bolus, cangrelor mainly impacts on the flux of HDL-cholesterol from peripheral cells to the liver rather than HDL particle pool size while both flux and pool size of HDL are modified under continuous delivery of cangrelor. Also, bolus injection of cangrelor promotes the secretion of all biliary lipids (cholesterol, BA and PL) [10] whereas continuous delivery of the molecule only increases biliary secretion of BA, suggesting metabolic adaptations might occur under continuous activation of P2Y₁₃. However the absence of effect of cangrelor continuous delivery on biliary secretion of other lipids is intriguing since it is usually reported that biliary BA secretion is coupled to biliary secretion of phospholipid and cholesterol [26]. Thus, further experiments targeting P2Y₁₃ in a different way, for instance by longer treatment with cangrelor (> 3 days) or by using another class of P2Y₁₃ agonist that would be more stable than cangrelor or mice model overexpressing P2Y₁₃ on hepatocytes, should bring more insight on the effect of P2Y₁₃ activation on biliary lipid secretion.

Altogether, our study suggests that P2Y₁₃ activation by cangrelor principally targets HDL metabolism in mice by stimulating hepatic HDL uptake and biliary BA excretion. Several human clinical trials using cangrelor infusion for up to 72 h have been performed, all aiming to investigate its antagonism on P2Y₁₂ in platelet biology and its potential beneficial action in preventing arterial thrombosis, but plasma lipid parameters have never been measured or reported in those studies

[12,9]. Thus, whether similar effect of cangrelor, targeting HDL metabolism, can be expected in human would need further investigation, for instance by studying the effect of cangrelor on humanized mice models such as cholesteryl ester transfer protein (CETP) transgenic mice [27].

To date, therapies that can raise HDL-cholesterol level, including fibrates, niacin or statins have major impacts on other lipid targets, like low density lipoprotein (LDL) or triglycerides (TG) and their effects on HDL are modest [28]. Over the last few years, blocking the transfer of cholesterol esters from HDL to the LDL clearance pathway by inhibiting CETP has been considered as a promising strategy to raise HDL-cholesterol [29]. However, the premature termination of phase III clinical trials of CETP inhibitors, torcetrapid and dalcetrapib, due to adverse effects or lack of clinically efficacy on lowering cardiovascular risk respectively, has led to considerable doubt about the value of raising HDL-cholesterol as a treatment for cardiovascular disease [30,31]. These results have unveiled the complexity of HDL metabolism, supporting the concept that the flux of HDL-cholesterol is more important than steady-state concentrations for protection against atherosclerosis, with functional quality being certainly a more important consideration than the circulating quantity of HDL [32]. According to this concept, stimulation of RCT would efficiently remove excess cholesterol from the body with no effect on HDL levels, even more so decreasing HDL [33], as observed when P2Y₁₃ receptor is stimulated by continuous administration of cangrelor. Thus, increasing the activity of P2Y₁₃ should have an anti-atherogenic effect. An alternative perspective would suggest that increased activity of P2Y₁₃ should increase susceptibility to atherosclerosis by decreasing HDL-cholesterol plasma concentration. This relates to the multiple *in vitro* and *in vivo* studies that have attributed antiatherogenic properties to the HDL particle itself, such as acting as an antioxidant and preventing LDL modification [2], effects that would be diminished at reduced plasma concentrations of this lipoprotein. Analysis of atherosclerosis susceptibility on mouse model for atherosclerosis treated for longer with cangrelor or with another class of P2Y₁₃ agonists may offer an important insight into the role of P2Y₁₃ as a potentially manipulable target in atherosclerosis.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbali.2012.12.006>.

Funding

This study was supported by the INSERM Avenir Grant, the National Research Agency (ANR Emergence and GENO #102 01) and the Midi-Pyrénées Region. LL is a recipient of the Marie Curie IEF fellowship.

Acknowledgements

We thank the technical service of the animal facility (Genotoul Anexplo Platform, Toulouse).

We thank J. Bertrand-Michel and V. Roques (MetaToul-Lipidomic Core Facility INSERM UMR 1048, France, part of Toulouse Metatoul Plateform) and Eric Lacoste (Synelvia, Prologue Biotech, Labège, France) for lipidomic analysis, advice and technical assistance.

References

- [1] I.M. Singh, M.H. Shishehbor, B.J. Ansell, High-density lipoprotein as a therapeutic target: a systematic review, *JAMA* 298 (2007) 786–798.
- [2] A. von Eckardstein, M. Hersberger, L. Rohrer, Current understanding of the metabolism and biological actions of HDL, *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 8 (2005) 147–152.
- [3] G.H. Rothblat, M.C. Phillips, High-density lipoprotein heterogeneity and function in reverse cholesterol transport, *Curr. Opin. Lipidol.* 21 (2010) 229–238.
- [4] B. Trigatti, A. Rigotti, M. Krieger, The role of the high-density lipoprotein receptor SR-BI in cholesterol metabolism, *Curr. Opin. Lipidol.* 11 (2000) 123–131.
- [5] L.O. Martinez, S. Jacquet, J.P. Esteve, C. Rolland, E. Cabezón, E. Champagne, T. Pineau, V. Georgeaud, J.E. Walker, F. Terce, X. Collet, B. Perret, R. Barbaras, Ectopic beta-chain of ATP synthase is an apolipoprotein A-I receptor in hepatic HDL endocytosis, *Nature* 421 (2003) 75–79.
- [6] S. Jacquet, C. Malaval, L.O. Martinez, K. Sak, C. Rolland, C. Perez, M. Nauze, E. Champagne, F. Terce, C. Gachet, B. Perret, X. Collet, J.M. Boeynaems, R. Barbaras, The nucleotide receptor P2Y₁₃ is a key regulator of hepatic high-density lipoprotein (HDL) endocytosis, *Cell. Mol. Life Sci.* 62 (2005) 2508–2515.
- [7] C. Malaval, M. Laffargue, R. Barbaras, C. Rolland, C. Peres, E. Champagne, B. Perret, F. Terce, X. Collet, L.O. Martinez, RhoA/ROCK 1 signalling downstream of the P2Y₁₃ ADP-receptor controls HDL endocytosis in human hepatocytes, *Cell. Signal.* 21 (2009) 120–127.
- [8] C. Gachet, P2 receptors, platelet function and pharmacological implications, *Thromb. Haemost.* 99 (2008) 466–472.
- [9] R.F. Storey, Pharmacology and clinical trials of reversibly-binding P2Y₁₂ inhibitors, *Thromb. Haemost.* 105 (Suppl.) (2011) S75–S81.
- [10] A.C. Fabre, C. Malaval, A. Ben Addi, C. Verdier, V. Pons, N. Serhan, L. Lichtenstein, G. Combes, T. Huby, F. Briand, X. Collet, N. Nijstad, U.J. Tietge, B. Robaye, B. Perret, J.M. Boeynaems, L.O. Martinez, P2Y₁₃ receptor is critical for reverse cholesterol transport, *Hepatology* 52 (2010) 1477–1483.
- [11] B.L. Trigatti, M. Krieger, A. Rigotti, Influence of the HDL receptor SR-BI on lipoprotein metabolism and atherosclerosis, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23 (2003) 1732–1738.
- [12] R.F. Storey, K.G. Oldroyd, R.G. Wilcox, Open Multicentre Study of the P2T Receptor Antagonist AR-C69931MX Assessing Safety, Tolerability and Activity in Patients with Acute Coronary Syndromes, 2001.
- [13] E.G. Bligh, W.J. Dyer, A rapid method of total lipid extraction and purification, *Can. J. Biochem. Physiol.* 37 (1959) 911–917.
- [14] C. Vieu, B. Jaspard, R. Barbaras, J. Manent, H. Chap, B. Perret, X. Collet, Identification and quantitation of diacylglycerols in HDL and accessibility to lipase, *J. Lipid Res.* 37 (1996) 1153–1161.
- [15] R. Barbaras, X. Collet, H. Chap, B. Perret, Specific binding of free apolipoprotein A-I to a high-affinity binding site on HepG2 cells: characterization of two high-density lipoprotein sites, *Biochemistry* 33 (1994) 2335–2340.
- [16] S. Kunnen, M. Van Eck, Lecithin:cholesterol acyltransferase: old friend or foe in atherosclerosis? *J. Lipid Res.* 53 (2012) 1783–1799.
- [17] N. Wang, T. Arai, Y. Ji, F. Rinninger, A.R. Tall, Liver-specific overexpression of scavenger receptor BI decreases levels of very low density lipoprotein ApoB, low density lipoprotein ApoB, and high density lipoprotein in transgenic mice, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 32920–32926.
- [18] Y. Ueda, L. Royer, E. Gong, J. Zhang, P.N. Cooper, O. Francone, E.M. Rubin, Lower plasma levels and accelerated clearance of high density lipoprotein (HDL) and non-HDL cholesterol in scavenger receptor class B type I transgenic mice, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 7165–7171.
- [19] D.L. Silver, N. Wang, X. Xiao, A.R. Tall, High density lipoprotein (hdl) particle uptake mediated by scavenger receptor class b type 1 results in selective sorting of hdl cholesterol from protein and polarized cholesterol secretion, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 25287–25293.
- [20] M. Van Eck, J. Twisk, M. Hoekstra, B.T. Van Rij, C.A. Van der Lans, I.S. Bos, J.K. Kruijt, F. Kuipers, T.J. Van Berkel, Differential effects of scavenger receptor BI deficiency on lipid metabolism in cells of the arterial wall and in the liver, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 23699–23705.
- [21] T.J. Nieland, M. Ehrlich, M. Krieger, T. Kirchhausen, Endocytosis is not required for the selective lipid uptake mediated by murine SR-BI, *Biochim. Biophys. Acta* 1734 (2005) 44–51.
- [22] B. Sun, E.R. Eckhardt, S. Shetty, D.R. van der Westhuyzen, N.R. Webb, Quantitative analysis of SR-BI-dependent HDL retroendocytosis in hepatocytes and fibroblasts, *J. Lipid Res.* 47 (2006) 1700–1713.
- [23] J.L. Goldstein, R.A. DeBoise-Boyd, M.S. Brown, Protein sensors for membrane sterols, *Cell* 124 (2006) 35–46.
- [24] K.F. Kozarsky, M.H. Donahee, A. Rigotti, S.N. Iqbal, E.R. Edelman, M. Krieger, Overexpression of the HDL receptor SR-BI alters plasma HDL and bile cholesterol levels, *Nature* 387 (1997) 414–417.
- [25] H. Wiersma, A. Gatti, N. Nijstad, R.P. Oude Elferink, F. Kuipers, U.J. Tietge, Scavenger receptor class B type I mediates biliary cholesterol secretion independent of ATP-binding cassette transporter g5/g8 in mice, *Hepatology* 50 (2009) 1263–1272.
- [26] A.A. Hışmıoğlu, A.M. Bozdayı, K. Rahman, Biliary lipid secretion, *Turk. J. Gastroenterol.* 18 (2007) 65–70.
- [27] M. El Bouhassani, S. Gilibert, M. Moreau, F. Saint-Charles, M. Treguier, F. Poti, M.J. Chapman, W. Le Goff, P. Lesnik, T. Huby, M. Tréguier, Cholesteryl ester transfer protein expression partially attenuates the adverse effects of SR-BI receptor deficiency on cholesterol metabolism and atherosclerosis, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 17227–17238.
- [28] T. Joy, R.A. Hegele, Is raising HDL a futile strategy for atheroprotection? *Nat. Rev. Drug Discov.* 7 (2008) 143–155.
- [29] D.E. Gutstein, R. Krishna, D. Johns, H.K. Surks, H.M. Dansky, S. Shah, Y.B. Mitchel, J. Arena, J.A. Wagner, Anacetrapib, a novel CETP inhibitor: pursuing a new approach to cardiovascular risk reduction, *Clin. Pharmacol. Ther.* 91 (2012) 109–122.
- [30] A. Kontush, M. Guerin, M.J. Chapman, Spotlight on HDL-raising therapies: insights from the torcetrapib trials, *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* 5 (2008) 329–336.
- [31] D. Rhainds, B.J. Arseneault, M.R. Brodeur, J.-C. Tardif, An update on the clinical development of dalcetrapib (RO4607381), a cholesteryl ester transfer protein modulator that increases HDL cholesterol levels, *Future Cardiol.* 8 (2012) 513–531.
- [32] S.J. Nicholls, HDL: still a target for new therapies? *Curr. Opin. Investig. Drugs* 9 (2008) 950–956.
- [33] G.A. Francis, The complexity of HDL, *Biochim. Biophys. Acta* 1801 (2010) 1286–1293.

c. Conclusion :

Alors qu'une injection *bolus* de cangrelor, agoniste partiel de P2Y₁₃, se traduit par une stimulation de la captation des HDL et des sécrétions biliaires sans modification des taux lipidiques plasmatiques, l'injection chronique de cangrelor n'impacte pas le métabolisme de la même façon. En effet, l'administration pendant trois jours de ce composé est associée à une augmentation de la clairance hépatique des HDL par le foie corrélée à une diminution de la concentration sérique en HDL ainsi qu'à une modification de leur composition (diminution du contenu en cholestérol libre et augmentation du contenu en triglycérides). Concernant les lipides biliaires, nous remarquons également que les sécrétions en cholestérol et phospholipides sont inchangées sous activation de la voie au contraire de la sécrétion en acides biliaires qui est significativement augmentée. Au niveau des régulations géniques dans le foie, on ne note pas de différence d'expression des gènes impliqués dans la captation des HDL (*scarb1*, *p2y13* ou *atp5b*) ou dans l'efflux de cholestérol (*abca1*, *abcg1* ou *abcg5/g8*). De même, l'expression des ARNm des cytochromes impliqués dans la biosynthèse des acides biliaires (*cyp7a1*, *cyp27a1*, *cyp8b1*) ou des transporteurs contrôlant les flux hépatiques d'acides biliaires (*bcep*, *ntcp*, *oatp*) n'est pas différente entre les groupes de souris. En revanche, la stimulation chronique de la voie de la F₁-ATPase/P2Y₁₃ chez la souris est associée à l'augmentation d'expression de deux enzymes impliquées dans la biosynthèse du cholestérol (*hmgcr* et *hmgcs*) ainsi que de *srebp2* et *ldlr*. Il est maintenant connu que les trois isoformes de SREBP régulent directement l'expression de plus de 30 gènes impliqués dans la synthèse et la capture du cholestérol, des acides gras ou des triglycérides. C'est notamment le cas de SREBP2 qui active préférentiellement les gènes du métabolisme du cholestérol (Horton, Goldstein, & Brown, 2002). A l'état basal, SREBP2 est enchâssée dans la membrane du réticulum endoplasmique (RE) avec une autre protéine, la protéine SCAP (SREBP-cleavage activating protein). Quand la cellule se charge en cholestérol, il en va de même du RE et SCAP est modifiée dans sa conformation. Elle se lie alors à une autre protéine elle aussi présente dans la membrane du réticulum, la protéine *Insig*. Cette association ralentit le transport du complexe SREBP/SCAP vers l'appareil de Golgi entraînant ainsi une baisse de l'activation protéolytique du précurseur de SREBP dans le Golgi (Sato, 2010). SREBP2 est donc présent à l'état inactif dans la membrane du RE. C'est un clivage protéolytique qui le rend actif lors de déplétion en cholestérol. Dans notre étude, l'usage de

cangrelor semble activer SREBP2 ce qui se traduit par une augmentation d'expression des ARNm de gènes impliqués dans la biosynthèse du cholestérol (*hmgcr*, *hmgcs*) ou dans sa captation (*ldlr*). Il serait donc possible que la voie de la F_1 -ATPase/P2Y₁₃ stimule la captation des particules HDL et oriente le cholestérol non pas vers un stockage cellulaire mais vers un catabolisme accru en acides biliaires. Sous stimulation de P2Y₁₃, le trafic intra-cellulaire du cholestérol pourrait donc être différent ; en favorisant l'excrétion biliaire, il y aurait une déplétion en cholestérol du RE qui pourrait expliquer les variations d'expression génique constatées.

CHAPITRE V :

PERSPECTIVES

A) P2Y₁₃ : une cible potentielle pour lutter contre l'athérosclérose ?

Nous avons donc vu le rôle central du récepteur P2Y₁₃ dans le métabolisme du HDL. Son invalidation est en effet associée à une diminution de la concentration en cholestérol dans le foie et la bile alors que son activation, par injection *bolus* d'un agoniste partiel, stimule la captation hépatique du cholestérol HDL ainsi que les sécrétions biliaires. Sa stimulation chronique s'accompagne également d'un effet bénéfique puisque les concentrations en HDL-C diminuent alors que la clairance hépatique du cholestérol et du flux des sécrétions biliaires augmentent. Toutefois, le modèle que nous utilisons est fort éloigné de l'homme. En effet, les souris ne possèdent pas de **CETP** ce qui crée un profil lipoprotéique plasmatique différent de celui de l'homme avec une proportion inversée des taux de LDL-C et de HDL-C. Il serait donc intéressant de réaliser le même type d'expériences chez des souris exprimant la CETP afin de voir si l'évolution du profil suit le même schéma que chez leurs congénères n'exprimant pas cette protéine. De même, les souris n'expriment **NPC1L1** qu'au niveau de la face apicale entérocytaire ce qui leur permet d'absorber le cholestérol alors que chez l'homme, ce transporteur est aussi exprimé au niveau de la membrane canaliculaire hépatocytaire, ce qui permet la réabsorption hépatique du cholestérol biliaire. L'expression de NPC1L1 par le foie chez des souris est d'ailleurs associée à une diminution de la concentration biliaire en cholestérol (Pramfalk, Jiang, & Parini, 2011). Il serait donc intéressant de voir l'effet de l'activation chronique du récepteur P2Y₁₃ chez des souris transgéniques pour NPC1L1 : est-ce que les concentrations en cholestérol biliaire sont modifiées ? Si tel est le cas, l'ajout d'ézétimibe à un agoniste de P2Y₁₃ pourrait s'avérer être un choix intéressant.

B) Polymorphismes de P2RY₁₃ et des autres partenaires du métabolisme des HDL :

Afin de mieux appréhender l'importance de la voie de la F₁-ATPase/P2Y₁₃ dans la régulation des taux de HDL-C et de son impact dans la modulation du risque d'athérosclérose, nous avons décidé d'étudier l'ensemble des SNP connus de cette voie dans notre étude cas-témoins GENES. Nous avons dressé une liste de SNP liés à **P2RY13**, **ATPIF1** et **ATP5B** à partir des banques de données HapMap et Ensembl Genome Browser. Nous avons également ajouté un autre gène partenaire de cette voie, le gène codant le facteur couplant

6 (CF6), le gène **ATP5J**. Cette protéine **CF6** compose une partie de la tige périphérique reliant la sous-unité F₁ de la sous-unité F₀ de l'ATP synthase mitochondriale. Elle est relarguée de la membrane plasmique des cellules endothéliales à partir de l'ATP-synthase de surface et peut être mesurée dans le sang circulant. Il a en particulier été montré que c'est un inhibiteur de la synthèse endothéliale de prostacycline et que des taux élevés sont associés à de l'hypertension (Osanai, Magota, & Okumura, 2009). De plus, deux études portant chez des sujets faisant un IDM ou souffrant de maladie coronarienne ont mis en évidence des taux plasmatiques significativement plus élevés de CF6 que chez les sujets sains ou par rapport à ces mêmes sujets en dehors d'épisode aigu (Chai, Hui, Li, & Tang, 2007; Ding *et al*, 2004). Nous avons voulu également étudier SR-BI qui est l'autre voie connue de captation du cholestérol HDL, mais également les partenaires majeurs du métabolisme HDL avec **ABCA1**, **ABCG1**, **LCAT**, **CETP**, **LIPG**, **PLTP**, **LPL** et **LIPC**. Enfin, nous avons également inclus deux autres récepteurs purinergiques, **P2RY1** et **P2RY12** qui sont synténiques de **P2Y13** et deux autres gènes, dont l'implication a été retrouvée dans les GWAS mais sans explication physiopathologique connue (**GALNT2** et **MVK/MMAB**). L'ensemble des SNP (tableau 20) sera étudié par la technologie **Fluidigm®** grâce à des cartes permettant d'analyser en même temps 96 SNP par individus.

Gène	SNP étudiés
<i>P2RY13</i>	rs1466684, rs3732757, rs6440735, rs12497019, rs17204376, rs7644001, rs3971192, rs10513393, rs8180086, rs61736003, rs145063671, rs148292157, rs150366287, rs149544268, rs188633801, rs147188000, rs138841969, rs144496684, rs144128158, rs146597143, rs141361811, rs139632884, Val266Ala, rs6794283, rs141257296, rs1388628, rs1491980, rs11712291, rs1388627, rs112766831
<i>ATPIF1</i>	rs9508, rs2078348, rs12129745, rs17185150, rs8559, rs6686978, rs580800, rs139508352, rs146571336, rs115825196, rs141948364, rs139876260, rs113261974, rs137941207, rs113339056, rs11539747
<i>ATP5J</i>	rs11909995, rs928265, rs12482698, rs13048710, rs2829887, rs2829877, rs113085027, rs73897037, rs1803181, rs182225698, rs73338261, rs140201687, rs71649640, rs138359468, rs11539867, rs11539871
<i>ATP5B</i>	rs2255074, rs9634246
<i>SCARB1 (CLA1)</i>	rs5888, rs4238001, rs5891, rs61932577, rs10846744
<i>ABCA1</i>	rs3890182, rs1883025
<i>ABCG1</i>	rs1893590, rs57137919
<i>LCAT</i>	rs16942887, rs2271293
<i>CETP</i>	rs3764261, rs173539, rs708272
<i>PLTP</i>	rs6065904, rs6065906
<i>LIPG</i>	rs7228085, rs7241918, rs4939883
<i>LPL</i>	rs17091905, rs12678919
<i>LIPC</i>	rs1532085, rs1800588, rs10468017
<i>P2RY1</i>	rs16864613, rs701265, rs12497578
<i>P2RY12</i>	rs2046934, rs6809699
<i>GALNT2</i>	rs4846914
<i>MVK/MMAB</i>	rs7134594, rs2338104

Tableau 20 : Liste des SNP étudiés par la technologie Fluidigm dans l'étude cas-témoins GENES.

Au final, cette approche pourrait nous permettre de :

- **Valider** chez l'homme l'importance de la voie F_1 -ATPase/ $P2Y_{13}$ en comparant notamment les effets des variations de ses SNP par rapport à ceux de SR-BI.
- Étudier l'effet de l'ensemble des SNP de cette voie en cumulant leurs effets (création d'une carte de score génétique) afin d'**évaluer** leur impact, non seulement sur le profil lipoprotéique plasmatique, mais aussi sur les nombreux marqueurs clinico-biologiques que nous possédons dans cette étude (avec par exemple, chez les cas, l'index bras-cheville et les différents scores d'extension de la maladie coronarienne, ainsi que la fraction d'éjection ventriculaire gauche). Il pourrait être également intéressant de doser les taux sériques de C4 (biomarqueur de la synthèse des acides biliaires) chez les sujets porteurs de la mutation silencieuse du codon codant pour l'isoleucine en position 80. Nous avons en effet vu que les sécrétions biliaires étaient modifiées chez les souris lors de l'activation ou de l'inactivation de $P2Y_{13}$, il sera donc

intéressant d'étudier l'effet de la mutation de ce récepteur chez l'homme. De telles études ont déjà été effectuées chez des sujets porteurs de mutations monogéniques impactant le métabolisme du HDL mais aucune modification de ce marqueur n'a pu jusqu'à présent être mise en évidence (Steiner *et al.*, 2012).

- Pour les SNP qui sont retrouvés rarement, une étude approfondie des phénotypes des sujets pourra nous amener à **tester** *in vitro* en culture l'effet de ces mutations.

Les SNP déjà connus nous permettront de valider notre étude et de voir si ce qui a été trouvé dans la littérature s'applique également dans notre cas. De plus, il faudra que nous étudions les SNP significatifs dans d'autres études afin de les répliquer et les confirmer.

BIBLIOGRAPHIE

- Abbracchio, M. P., Burnstock, G., Boeynaems, J., Barnard, E. A., Boyer, J. L., Kennedy, C., ... Weisman, G. A. (2006). International Union of Pharmacology LVIII : Update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors : from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacological Reviews*, 58(3), 281–341.
- Abifadel, M., Rabès, J.-P., Devillers, M., Munnich, A., Erlich, D., Junien, C., ... Boileau, C. (2009). Mutations and polymorphisms in the proprotein convertase subtilisin kexin 9 (PCSK9) gene in cholesterol metabolism and disease. *Human mutation*, 30(4), 520–9.
- Abifadel, M., Varret, M., Rabès, J.-P., Allard, D., Ouguerram, K., Devillers, M., ... Boileau, C. (2003). Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nature genetics*, 34(2), 154–6.
- Abourbih, S., Filion, K. B., Joseph, L., Schiffrin, E. L., Rinfret, S., Poirier, P., ... Eisenberg, M. J. (2009). Effect of fibrates on lipid profiles and cardiovascular outcomes: a systematic review. *The American journal of medicine*, 122(10), 962.e1–8.
- Acton, S., Osgood, D., Donoghue, M., Corella, D., Pocovi, M., Cenarro, a., ... Ordovas, J. M. (1999). Association of Polymorphisms at the SR-BI Gene Locus With Plasma Lipid Levels and Body Mass Index in a White Population. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 19(7), 1734–1743.
- Agerholm-Larsen, B., Nordestgaard, B. G., Steffensen, R., Jensen, G., & Tybjærg-Hansen, a. (2000). Elevated HDL Cholesterol Is a Risk Factor for Ischemic Heart Disease in White Women When Caused by a Common Mutation in the Cholesteryl Ester Transfer Protein Gene. *Circulation*, 101(16), 1907–1912.
- Albers, J. J., Vuletic, S., & Cheung, M. C. (2012). Role of plasma phospholipid transfer protein in lipid and lipoprotein metabolism. *Biochimica et biophysica acta*, 1821(3), 345–357.
- Alexander, E. T., Tanaka, M., Kono, M., Saito, H., Rader, D. J., & Phillips, M. C. (2009). Structural and functional consequences of the Milano mutation (R173C) in human apolipoprotein A-I. *Journal of lipid research*, 50(7), 1409–19.
- Almal, S. H., & Padh, H. (2012). Implications of gene copy-number variation in health and diseases. *Journal of human genetics*, 57(1), 6–13.
- Amisten, S., Meidute-Abaraviciene, S., Tan, C., Olde, B., Lundquist, I., Salehi, a, & Erlinge, D. (2010). ADP mediates inhibition of insulin secretion by activation of P2Y13 receptors in mice. *Diabetologia*, 53(9), 1927–34.
- Amisten, Stefan, Braun, O. O., Johansson, L., Ridderstråle, M., Melander, O., & Erlinge, D. (2008). The P2Y 13 Met-158-Thr polymorphism, which is in linkage disequilibrium with the P2Y 12 locus, is not associated with acute myocardial infarction. *PloS one*, 3(1), e1462.
- Andersen, R. V., Wittrup, H. H., Tybjærg-Hansen, A., Steffensen, R., Schnohr, P., & Nordestgaard, B. G. (2003). Hepatic lipase mutations, elevated high-density lipoprotein

- cholesterol, and increased risk of ischemic heart disease. *Journal of the American College of Cardiology*, 41(11), 1972–1982.
- Annema, W., & Tietge, U. J. F. (2011). Role of hepatic lipase and endothelial lipase in high-density lipoprotein-mediated reverse cholesterol transport. *Current atherosclerosis reports*, 13(3), 257–65.
- Arai, T. (1999). Decreased Atherosclerosis in Heterozygous Low Density Lipoprotein Receptor-deficient Mice Expressing the Scavenger Receptor BI Transgene. *Journal of Biological Chemistry*, 274(4), 2366–2371.
- Asselbergs, F. W., Guo, Y., van Iperen, E. P. a, Sivapalaratnam, S., Tragante, V., Lanktree, M. B., ... Barnard, J. (2012). Large-scale gene-centric meta-analysis across 32 studies identifies multiple lipid loci. *American journal of human genetics*, 91(5), 823–38.
- Asztalos, B. F., Demissie, S., Cupples, L. A., Collins, D., Cox, C. E., Horvath, K. V, ... Schaefer, E. J. (2006). LpA-I, LpA-I:A-II HDL and CHD-risk: The Framingham Offspring Study and the Veterans Affairs HDL Intervention Trial. *Atherosclerosis*, 188(1), 59–67.
- Attia, J., Ioannidis, J. P. a, Thakkinstian, A., McEvoy, M., Scott, R. J., Minelli, C., ... Guyatt, G. (2009). How to use an article about genetic association: B: Are the results of the study valid? *JAMA : the journal of the American Medical Association*, 301(2), 191–7.
- Aulchenko, Y. S., Ripatti, S., Lindqvist, I., Boomsma, D., Heid, I. M., Pramstaller, P. P., ... Spector, T. (2009). Loci influencing lipid levels and coronary heart disease risk in 16 European population cohorts. *Nature genetics*, 41(1), 47–55.
- Baigent, C., Keech, a, Kearney, P. M., Blackwell, L., Buck, G., Pollicino, C., ... Simes, R. (2005). Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins. *Lancet*, 366(9493), 1267–78.
- Baldán, A., Bojanic, D. D., & Edwards, P. a. (2009). The ABCs of sterol transport. *Journal of lipid research*, 50 Suppl, S80–S85.
- Baroukh, N., Lopez, C. E., Saleh, M.-C., Recalde, D., Vergnes, L., Ostos, M. a, ... Ochoa, A. (2004). Expression and secretion of human apolipoprotein A-I in the heart. *FEBS Letters*, 557(1-3), 39–44.
- Barter, P. J. (2003). Cholesteryl Ester Transfer Protein: A Novel Target for Raising HDL and Inhibiting Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 23(2), 160–167.
- Barter, Philip J, Rye, K.-A., Tardif, J.-C., Waters, D. D., Boekholdt, S. M., Breazna, A., & Kastelein, J. J. P. (2011). Effect of torcetrapib on glucose, insulin, and hemoglobin A1c in subjects in the Investigation of Lipid Level Management to Understand its Impact in Atherosclerotic Events (ILLUMINATE) trial. *Circulation*, 124(5), 555–62.

- Barzilai, N, Atzmon, G., Derby, C. a, Bauman, J. M., & Lipton, R. B. (2006). A genotype of exceptional longevity is associated with preservation of cognitive function. *Neurology*, 67(12), 2170–5.
- Barzilai, Nir, Atzmon, G., Schechter, C., Schaefer, E. J., Cupples, A. L., Lipton, R., ... Shuldiner, A. R. (2003). Unique lipoprotein phenotype and genotype associated with exceptional longevity. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, 290(15), 2030–2040.
- Bauters, C. (n.d.). Physiopathologie de l'athérosclérose. Retrieved October 19, 2013, from http://www.pifo.uvsq.fr/hebergement/cec_mv/128b.pdf
- Benoit, P., Emmanuel, F., Caillaud, J. M., Bassinet, L., Castro, G., Gallix, P., ... Duverger, N. (1999). Somatic gene transfer of human apoA-I inhibits atherosclerosis progression in mouse models. *Circulation*, 99, 105–110.
- Bergfeld, G. R., & Forrester, T. (1992). Release of ATP from human erythrocytes in response to a brief period of hypoxia and hypercapnia. *Cardiovascular research*, 26, 40–47.
- Besler, C., Heinrich, K., Rohrer, L., Doerries, C., Riwanto, M., Shih, D. M., ... Landmesser, U. (2011). Mechanisms underlying adverse effects of HDL on eNOS-activating pathways in patients with coronary artery disease. *The Journal of clinical investigation*, 121(7), 2693–2708.
- Besler, C., Lüscher, T. F., & Landmesser, U. (2012). Molecular mechanisms of vascular effects of High-density lipoprotein: alterations in cardiovascular disease. *EMBO molecular medicine*, 4(4), 251–68.
- Bielicki, J. K., & Oda, M. N. (2002). Apolipoprotein A-I(Milano) and apolipoprotein A-I(Paris) exhibit an antioxidant activity distinct from that of wild-type apolipoprotein A-I. *Biochemistry*, 41(6), 2089–96.
- Biver, G., Wang, N., Gartland, A., Orriss, I., Arnett, T. R., Boeynaems, J.-M., & Robaye, B. (2013). Role of the P2Y₁₃ receptor in the differentiation of bone marrow stromal cells into osteoblasts and adipocytes. *Stem cells (Dayton, Ohio)*.
- Blom, D., Yamin, T.-T., Champy, M.-F., Selloum, M., Bedu, E., Carballo-Jane, E., ... Puig, O. (2010). Altered lipoprotein metabolism in P2Y₁₃ knockout mice. *Biochimica et biophysica acta*, 1801(12), 1349–60.
- Boekholdt, S M, Sacks, F. M., Jukema, J. W., Shepherd, J., Freeman, D. J., McMahon, a D., ... Kastelein, J. J. P. (2005). Cholesteryl ester transfer protein TaqIB variant, high-density lipoprotein cholesterol levels, cardiovascular risk, and efficacy of pravastatin treatment: individual patient meta-analysis of 13,677 subjects. *Circulation*, 111(3), 278–87.
- Boekholdt, S Matthijs, Kuivenhoven, J.-A., Hovingh, G. K., Jukema, J. W., Kastelein, J. J., & van Tol, A. (2004). CETP gene variation: relation to lipid parameters and cardiovascular risk. *Current Opinion in Lipidology*, 15(4), 393–398.

- Boekholdt, S Matthijs, Kuivenhoven, J.-A., Wareham, N. J., Peters, R. J. G., Jukema, J. W., Luben, R., ... Khaw, K.-T. (2004). Plasma levels of cholesteryl ester transfer protein and the risk of future coronary artery disease in apparently healthy men and women: the prospective EPIC (European Prospective Investigation into Cancer and nutrition)-Norfolk population study. *Circulation*, 110(11), 1418–23.
- Bouisset, F., Bongard, V., Ruidavets, J.-B., Hascoët, S., Taraszkiewicz, D., Roncalli, J., ... Ferrières, J. (2012). Prognostic usefulness of clinical and subclinical peripheral arterial disease in men with stable coronary heart disease. *The American journal of cardiology*, 110(2), 197–202.
- Bouly, M., Masson, D., Gross, B., Jiang, X. C., Fievet, C., Castro, G., ... Luc, G. (2001). Induction of the phospholipid transfer protein gene accounts for the high density lipoprotein enlargement in mice treated with fenofibrate. *The Journal of biological chemistry*, 276(28), 25841–7.
- Brest, P., Lapaquette, P., Souidi, M., Lebrigand, K., Cesaro, A., Vouret-Craviari, V., ... Hofman, P. (2011). A synonymous variant in IRGM alters a binding site for miR-196 and causes deregulation of IRGM-dependent xenophagy in Crohn's disease. *Nature genetics*, 43(3), 242–5.
- Brown, R. J., Lagor, W. R., Sankaranarayanan, S., Yasuda, T., Quertermous, T., Rothblat, G. H., & Rader, D. J. (2010). Impact of combined deficiency of hepatic lipase and endothelial lipase on the metabolism of both high-density lipoproteins and apolipoprotein B-containing lipoproteins. *Circulation research*, 107(3), 357–64.
- Bruce, C., Sharp, D. S., & Tall, a R. (1998). Relationship of HDL and coronary heart disease to a common amino acid polymorphism in the cholesteryl ester transfer protein in men with and without hypertriglyceridemia. *Journal of lipid research*, 39(5), 1071–8.
- Brufau, G., Canela, M. A., & Rafecas, M. (2008). Phytosterols: physiologic and metabolic aspects related to cholesterol-lowering properties. *Nutrition research (New York, N.Y.)*, 28(4), 217–25.
- Brufau, G., Groen, A. K., & Kuipers, F. (2011). Reverse cholesterol transport revisited: contribution of biliary versus intestinal cholesterol excretion. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 31(8), 1726–33.
- Brunham, L R, Tietjen, I., Bochem, a E., Singaraja, R. R., Franchini, P. L., Radomski, C., ... Hayden, M. R. (2011). Novel mutations in scavenger receptor BI associated with high HDL cholesterol in humans. *Clinical genetics*, 79(6), 575–81.
- Brunham, Liam R, Kruit, J. K., Iqbal, J., Fievet, C., Timmins, J. M., Pape, T. D., ... Hayden, M. R. (2006). Intestinal ABCA1 directly contributes to HDL biogenesis in vivo. *Journal of Clinical Investigation*, 116(4), 1052–1062.

- Brunham, Liam R, Kruit, J. K., Pape, T. D., Timmins, J. M., Reuwer, A. Q., Vasanji, Z., ... Hayden, M. R. (2007). Beta-cell ABCA1 influences insulin secretion, glucose homeostasis and response to thiazolidinedione treatment. *Nature medicine*, 13(3), 340–7.
- C4D (the coronary artery disease) Genetics Consortium. (2011). A genome-wide association study in Europeans and South Asians identifies five new loci for coronary artery disease. *Nature genetics*, 43(4), 339–44.
- Calvo, D., Gómez-Coronado, D., Lasunción, M. A., & Vega, M. A. (1997). CLA-1 is an 85-kD plasma membrane glycoprotein that acts as a high-affinity receptor for both native (HDL, LDL, and VLDL) and modified (OxLDL and AcLDL) lipoproteins. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 17, 2341–2349.
- Camont, L., Chapman, M. J., & Kontush, A. (2011). Biological activities of HDL subpopulations and their relevance to cardiovascular disease. *Trends in molecular medicine*, 17(10), 594–603.
- Campanella, M., Casswell, E., Chong, S., Farah, Z., Wieckowski, M. R., Abramov, A. Y., ... Duchen, M. R. (2008). Regulation of mitochondrial structure and function by the F1Fo-ATPase inhibitor protein, IF1. *Cell metabolism*, 8(1), 13–25.
- Catanese, M. T., Ansuini, H., Graziani, R., Huby, T., Moreau, M., Ball, J. K., ... Nicosia, A. (2010). Role of scavenger receptor class B type I in hepatitis C virus entry: kinetics and molecular determinants. *Journal of virology*, 84(1), 34–43.
- Cavelier, C., Lorenzi, I., Rohrer, L., & von Eckardstein, A. (2006). Lipid efflux by the ATP-binding cassette transporters ABCA1 and ABCG1. *Biochimica et biophysica acta*, 1761(7), 655–66.
- Cavelier, C., Ohnsorg, P. M., Rohrer, L., & Eckardstein, A. Von. (2012). The β -chain of cell surface FOF1 ATPase modulates apoA-I and HDL transcytosis through aortic endothelial cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 32, 131–139.
- Center for biomolecular science & Engineering, W. (n.d.). Comparing Human, Chimp, and Mouse genomes. Retrieved October 26, 2013, from http://cbse.soe.ucsc.edu/research/comp_genomics/human_chimp_mouse
- Ceryak, S., Bouscarel, B., & Fromm, H. (1993). Comparative binding of bile acids to serum lipoproteins and albumin. *Journal of lipid research*, 34(10), 1661–74.
- Chai, S. B., Hui, Y. M., Li, X. M., & Tang, C. S. (2007). Plasma level of mitochondrial coupling factor 6 increases in patients with coronary heart disease. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society*, 71(5), 693–7.
- Chasman, D. I., Paré, G., Mora, S., Hopewell, J. C., Peloso, G., Clarke, R., ... Ridker, P. M. (2009). Forty-three loci associated with plasma lipoprotein size, concentration, and cholesterol content in genome-wide analysis. *PLoS genetics*, 5(11), e1000730.

- Chatterjee, C., & Sparks, D. L. (2011). Hepatic lipase, high density lipoproteins, and hypertriglyceridemia. *The American journal of pathology*, 178(4), 1429–33.
- Chatterjee, C., & Sparks, D. L. (2012). Extracellular nucleotides inhibit insulin receptor signaling, stimulate autophagy and control lipoprotein secretion. *PloS one*, 7(5), e36916.
- Cheung, M. C., Vaisar, T., Han, X., Heinecke, J. W., & Albers, J. J. (2010). Phospholipid transfer protein in human plasma associates with proteins linked to immunity and inflammation. *Biochemistry*, 49(34), 7314–22.
- Chi, S. L., & Pizzo, S. V. (2006). Cell surface F1Fo ATP synthase: a new paradigm? *Annals of medicine*, 38(6), 429–38.
- Chinetti, G., Gbaguidi, F. G., Griglio, S., Mallat, Z., Antonucci, M., Poulain, P., ... Staels, B. (2000). CLA-1/SR-BI Is Expressed in Atherosclerotic Lesion Macrophages and Regulated by Activators of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors. *Circulation*, 101(20), 2411–2417.
- Cho, K., & Jonas, A. (2000). A key point mutation (V156E) affects the structure and functions of human apolipoprotein A-I. *Journal of Biological Chemistry*, 275(35), 26821–26827.
- Christensen, E. I., & Birn, H. (2002). Megalin and cubilin: multifunctional endocytic receptors. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 3(4), 256–66.
- Cockerill, G. W., Rye, K.-A., Gamble, J. R., Vadas, M. A., & Barter, P. J. (1995). High-density lipoproteins inhibit cytokine-induced expression of endothelial cell adhesion molecules. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 15(11), 1987–1994.
- Cohen, J. C., Boerwinkle, E., Mosley, T. H., & Hobbs, H. H. (2006). Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease. *The New England Journal of Medicine*, 354, 1264–1272.
- Collet, X., Tall, a R., Serajuddin, H., Guendouzi, K., Royer, L., Oliveira, H., ... Francone, O. L. (1999). Remodeling of HDL by CETP in vivo and by CETP and hepatic lipase in vitro results in enhanced uptake of HDL CE by cells expressing scavenger receptor B-I. *Journal of lipid research*, 40(7), 1185–93.
- Communi, D., Gonzalez, N. S., Detheux, M., Brézillon, S., Lannoy, V., Parmentier, M., & Boeynaems, J. M. (2001). Identification of a novel human ADP receptor coupled to G(i). *The Journal of biological chemistry*, 276(44), 41479–85.
- Cooke, J. P. (2003). NO and angiogenesis. *Atherosclerosis Supplements*, 4(4), 53–60.
- Covey, S. D., Krieger, M., Wang, W., Penman, M., & Trigatti, B. L. (2003). Scavenger receptor class B type I-mediated protection against atherosclerosis in LDL receptor-negative mice involves its expression in bone marrow-derived cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 23(9), 1589–94.

- Crestani, M., De Fabiani, E., Caruso, D., Mitro, N., Gilardi, F., Vigil Chacon, a B., ... Galli, G. (2004). LXR (liver X receptor) and HNF-4 (hepatocyte nuclear factor-4): key regulators in reverse cholesterol transport. *Biochemical Society transactions*, 32(Pt 1), 92–6.
- Cuchel, M., Meagher, E. a, du Toit Theron, H., Blom, D. J., Marais, a D., Hegele, R. a, ... Rader, D. J. (2013). Efficacy and safety of a microsomal triglyceride transfer protein inhibitor in patients with homozygous familial hypercholesterolaemia: a single-arm, open-label, phase 3 study. *Lancet*, 381(9860), 40–6.
- Dalla-Riva, J., Stenkula, K. G., Petrova, J., & Lagerstedt, J. O. (2013). Discoidal HDL and apoA-I-derived peptides improve glucose uptake in skeletal muscle. *Journal of lipid research*, 54(5), 1275–82.
- Davies, R. W., Dandona, S., Stewart, A. F. R., Chen, L., Ellis, S. G., Tang, W. H. W., ... Wells, G. a. (2010). Improved prediction of cardiovascular disease based on a panel of single nucleotide polymorphisms identified through genome-wide association studies. *Circulation. Cardiovascular genetics*, 3(5), 468–74.
- De Grooth, G. J., Klerkx, A. H. E. M., Stroes, E. S. G., Stalenhoef, A. F. H., Kastelein, J. J. P., & Kuivenhoven, J. A. (2004). A review of CETP and its relation to atherosclerosis. *Journal of lipid research*, 45(11), 1967–74.
- De Souza, J. a, Vindis, C., Nègre-Salvayre, A., Rye, K.-A., Couturier, M., Therond, P., ... Kontush, A. (2010). Small, dense HDL 3 particles attenuate apoptosis in endothelial cells: pivotal role of apolipoprotein A-I. *Journal of cellular and molecular medicine*, 14(3), 608–20.
- De Villiers, W. J., & Smart, E. J. (1999). Macrophage scavenger receptors and foam cell formation. *Journal of leukocyte biology*, 66(5), 740–6.
- Deguchi, H. (2001). Plasma glucosylceramide deficiency as potential risk factor for venous thrombosis and modulator of anticoagulant protein C pathway. *Blood*, 97(7), 1907–1914.
- Deguchi, Hiroshi, Fernández, J. a, & Griffin, J. H. (2002). Neutral glycosphingolipid-dependent inactivation of coagulation factor Va by activated protein C and protein S. *The Journal of biological chemistry*, 277(11), 8861–5.
- Deguchi, Hiroshi, Pecheniuk, N. M., Elias, D. J., Averell, P. M., & Griffin, J. H. (2005). High-density lipoprotein deficiency and dyslipoproteinemia associated with venous thrombosis in men. *Circulation*, 112(6), 893–9.
- Deguchi, Hiroshi, Yegneswaran, S., & Griffin, J. H. (2004). Sphingolipids as bioactive regulators of thrombin generation. *The Journal of biological chemistry*, 279(13), 12036–42.
- Del Puerto, A., Díaz-Hernández, J.-I., Tapia, M., Gomez-Villafuertes, R., Benitez, M. J., Zhang, J., ... Garrido, J. J. (2012). Adenylate cyclase 5 coordinates the action of ADP, P2Y1,

- P2Y₁₃ and ATP-gated P2X₇ receptors on axonal elongation. *Journal of cell science*, 125(Pt 1), 176–88.
- Demetz, E., Tancevski, I., Duwensee, K., Stanzl, U., Huber, E., Heim, C., ... Ritsch, A. (2012). Inhibition of hepatic scavenger receptor-class B type I by RNA interference decreases atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis*, 222(2), 360–6.
- Denis, M., Marcinkiewicz, J., Zaid, A., Gauthier, D., Poirier, S., Lazure, C., ... Prat, A. (2012). Gene inactivation of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 reduces atherosclerosis in mice. *Circulation*, 125(7), 894–901.
- Desrumaux, C., Deckert, V., Athias, a, Masson, D., Lizard, G., Palteau, V., ... Lagrost, L. (1999). Plasma phospholipid transfer protein prevents vascular endothelium dysfunction by delivering alpha-tocopherol to endothelial cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 13(8), 883–92.
- Di Angelantonio, E., & Butterworth, A. S. (2012). Clinical utility of genetic variants for cardiovascular risk prediction: a futile exercise or insufficient data? *Circulation. Cardiovascular genetics*, 5(4), 387–90.
- Diaz, M. N., Frei, B., Vita, J. A., & Keaney, J. F. J. (1997). Antioxidants and atherosclerotic heart disease. *The New England Journal of Medicine*, 337(6), 408–416.
- Ding, W. H., Chu, S. Y., Jiang, H. F., Cai, D. Y., Pang, Y. Z., Tang, C. S., & Qi, Y. F. (2004). Plasma mitochondrial coupling factor 6 in patients with acute myocardial infarction. *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension*, 27(10), 717–22.
- Doggen, C. J. M., Smith, N. L., Lemaitre, R. N., Heckbert, S. R., Rosendaal, F. R., & Psaty, B. M. (2004). Serum lipid levels and the risk of venous thrombosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 24(10), 1970–5.
- Drew, B. G., Duffy, S. J., Formosa, M. F., Natoli, A. K., Henstridge, D. C., Penfold, S. a, ... Kingwell, B. a. (2009). High-density lipoprotein modulates glucose metabolism in patients with type 2 diabetes mellitus. *Circulation*, 119(15), 2103–11.
- Drew, B. G., Rye, K.-A., Duffy, S. J., Barter, P., & Kingwell, B. a. (2012). The emerging role of HDL in glucose metabolism. *Nature reviews. Endocrinology*, 8(4), 237–45.
- Dugi, K. a., Brandauer, K., Schmidt, N., Nau, B., Schneider, J. G., Mentz, S., ... Kreuzer, J. (2001). Low Hepatic Lipase Activity Is a Novel Risk Factor for Coronary Artery Disease. *Circulation*, 104(25), 3057–3062.
- Dullaart, R. P. F., Dallinga-Thie, G. M., Wolffenbuttel, B. H. R., & van Tol, a. (2007). CETP inhibition in cardiovascular risk management: a critical appraisal. *European journal of clinical investigation*, 37(2), 90–8.

- Durand, G., & Beaudeau, J.-L. (2008). *Biochime médicale : marqueurs actuels et perspectives* (Première édition.). Tec & Doc Lavoisier.
- Edmondson, A. C., Braund, P. S., Stylianou, I. M., Khera, A. V., Nelson, C. P., Wolfe, M. L., ... Rader, D. J. (2011). Dense genotyping of candidate gene loci identifies variants associated with high-density lipoprotein cholesterol. *Circulation research*, 4(2), 145–155.
- El Bouhassani, M., Gilibert, S., Moreau, M., Saint-Charles, F., Tréguier, M., Poti, F., ... Huby, T. (2011). Cholesteryl ester transfer protein expression partially attenuates the adverse effects of SR-BI receptor deficiency on cholesterol metabolism and atherosclerosis. *The Journal of biological chemistry*, 286(19), 17227–38.
- Espada, S., Ortega, F., Molina-Jijón, E., Rojo, A. I., Pérez-Sen, R., Pedraza-Chaverri, J., ... Cuadrado, A. (2010). The purinergic P2Y(13) receptor activates the Nrf2/HO-1 axis and protects against oxidative stress-induced neuronal death. *Free radical biology & medicine*, 49(3), 416–26.
- Fabre, A. C., Malaval, C., Ben Addi, A., Verdier, C., Pons, V., Serhan, N., ... Martinez, L. O. (2010). P2Y13 receptor is critical for reverse cholesterol transport. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 52(4), 1477–83.
- Fan, Y.-M., Raitakari, O., Kähönen, M., Hutri-Kähönen, N., Juonala, M., Marniemi, J., ... Lehtimäki, T. (2009). Hepatic lipase promoter C-480T polymorphism is associated with serum lipids levels , but not subclinical atherosclerosis : The Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *Clinical genetics*, 76, 46–53.
- Farnier, M., Bonnet, F., Bruckert, E., Ferrières, J., & Paillard, F. (2006). Quand proposer une association d'hypolipémiants chez un patient non à l'objectif thérapeutique sous monothérapie ? *Site de internet de la NSFA*.
- Favari, E., Gomaschi, M., Zanotti, I., Bernini, F., Lee-Rueckert, M., Kovanen, P. T., ... Calabresi, L. (2007). A unique protease-sensitive high density lipoprotein particle containing the apolipoprotein A-I(Milano) dimer effectively promotes ATP-binding Cassette A1-mediated cell cholesterol efflux. *The Journal of biological chemistry*, 282(8), 5125–32.
- Ferrières, J., Bongard, V., Dallongeville, J., Arveiler, D., Cottel, D., Haas, B., ... Ruidavets, J.-B. (2009). Trends in plasma lipids, lipoproteins and dyslipidaemias in French adults, 1996-2007. *Archives of cardiovascular diseases*, 102(4), 293–301.
- Fitzgerald, M. L., Morris, a L., Chroni, a, Mendez, a J., Zannis, V. I., & Freeman, M. W. (2004). ABCA1 and amphipathic apolipoproteins form high-affinity molecular complexes required for cholesterol efflux. *Journal of lipid research*, 45(2), 287–94.
- Fleisher, L. N., Tall, a R., Witte, L. D., Miller, R. W., & Cannon, P. J. (1982). Stimulation of arterial endothelial cell prostacyclin synthesis by high density lipoproteins. *The Journal of biological chemistry*, 257(12), 6653–5.

- Fondation Suisse de Cardiologie. (n.d.). L'hyperlipidémie, brochure d'information à l'attention du patient. Retrieved October 19, 2013, from <http://www.prevention.ch/lhyperlipedemie.htm>
- Franceschini, G., Calabresi, L., Chiesa, G., Parolini, C., Sirtori, C. R., Canavesi, M., & Bernini, F. (1999). Increased Cholesterol Efflux Potential of Sera From ApoA-I Milano Carriers and Transgenic Mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 19(5), 1257–1262.
- Franceschini, G., Sirtori, C. R., Capurso, A., Weisgraber, K. H., & Mahley, R. W. (1980). A-I Milano apoprotein: Decreased high density lipoprotein cholesterol levels with significant lipoprotein modifications and without clinical atherosclerosis in an Italian family. *Journal of Clinical Investigation*, 66(November), 892–900.
- Friedman, R. C., Farh, K. K.-H., Burge, C. B., & Bartel, D. P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome research*, 19(1), 92–105.
- Frikke-schmidt, R. (2010). Genetic variation in the ABCA1 gene, HDL cholesterol, and risk of ischemic heart disease in the general population. *Atherosclerosis*, 208, 305–316.
- Garcia, A., Barbaras, R., Collet, X., Bogoy, A., Chap, H., & Perret, B. (1996). High-density lipoprotein 3 receptor-dependent endocytosis pathway in a human hepatoma cell line (HepG2). *Biochemistry*, 35(40), 13064–13071.
- Genoux, A., Pons, V., Radojkovic, C., Roux-Dalvai, F., Combes, G., Rolland, C., ... Martinez, L. O. (2011). Mitochondrial inhibitory factor 1 (IF1) is present in human serum and is positively correlated with HDL-cholesterol. *PloS one*, 6(9), e23949.
- Genoux, A., Ruidavets, J.-B., Ferrières, J., Combes, G., Lichtenstein, L., Pons, V., ... Martinez, L. O. (2013). Serum IF1 concentration is independently associated to HDL levels and to coronary heart disease: the GENES study. *Journal of lipid research*, 54(9), 2250–2258.
- Gersh, B. J., Sliwa, K., Mayosi, B. M., & Yusuf, S. (2010). Novel therapeutic concepts: the epidemic of cardiovascular disease in the developing world: global implications. *European heart journal*, 31(6), 642–8.
- Ginsberg, H. N. (2011). The ACCORD (Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes) Lipid trial: what we learn from subgroup analyses. *Diabetes care*, 34 Suppl 2, S107–8. doi:10.2337/dc11-s203
- Giorgio, V., Bisetto, E., Franca, R., Harris, D., Passamonti, S., & Lippe, G. (2010). The ectopic F(O)F(1) ATP synthase of rat liver is modulated in acute cholestasis by the inhibitor protein IF1. *Journal of Bioenergetics Biomembranes*, 42(2), 117–123.
- Glass, C. K., Pittman, R. C., Keller, G. a, & Steinberg, D. (1983). Tissue sites of degradation of apoprotein A-I in the rat. *The Journal of biological chemistry*, 258(11), 7161–7.
- Glass, C., Pittman, R. C., Civen, M., & Steinberg, D. (1985). Uptake of high-density lipoprotein-associated apoprotein A-I and cholesterol esters by 16 tissues of the rat in

- vivo and by adrenal cells and hepatocytes in vitro. *The Journal of biological chemistry*, 260(2), 744–50.
- Goldberg, A. C. (2013). Emerging low-density lipoprotein therapies: Microsomal triglyceride transfer protein inhibitors. *Journal of clinical lipidology*, 7(3 Suppl), S16–20.
- Goldberg, I. J. (1996). Lipoprotein lipase and lipolysis: central roles in lipoprotein metabolism and atherogenesis. *Journal of lipid research*, 37(4), 693–707.
- Goldenberg, I., Benderly, M., & Goldbourt, U. (2008). Update on the use of fibrates : focus on bezafibrate. *Vascular health and risk management*, 4(1), 131–141.
- Gordon, S. M., Hofmann, S., Askew, D. S., & Davidson, W. S. (2011). High density lipoprotein: it's not just about lipid transport anymore. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 22(1), 9–15.
- Goyal, J. (1997). Novel Function of Lecithin-Cholesterol Acyltransferase. HYDROLYSIS OF OXIDIZED POLAR PHOSPHOLIPIDS GENERATED DURING LIPOPROTEIN OXIDATION. *Journal of Biological Chemistry*, 272(26), 16231–16239.
- Green, P. S., Vaisar, T., Pennathur, S., Kulstad, J. J., Moore, A. B., Marcovina, S., ... Heinecke, J. W. (2009). Combined statin and niacin therapy remodels the high-density lipoprotein proteome. *Circulation*, 118(12), 1259–1267.
- Griffin, J. H., Kojima, K., Banka, C. L., Curtiss, L. K., & Fernández, J. a. (1999). High-density lipoprotein enhancement of anticoagulant activities of plasma protein S and activated protein C. *The Journal of clinical investigation*, 103(2), 219–27.
- Guendouzi, K., Jaspard, B., Barbaras, R., Motta, C., Vieu, C., Marcel, Y., ... Collet, X. (1999). Biochemical and physical properties of remnant-HDL2 and of pre beta 1-HDL produced by hepatic lipase. *Biochemistry*, 38(9), 2762–8.
- Guendouzi, Karim, Collet, X., Perret, B., Chap, H., & Barbaras, R. (1998). Remnant high density lipoprotein particles produced by hepatic lipase display high-affinity binding and increased endocytosis into a human hepatoma cell line (HEPG2). *Biochemistry*, 37, 14974–14980.
- Haase, C. L., Tybjaerg-Hansen, A., Qayyum, A. A., Schou, J., Nordestgaard, B. G., & Frikke-Schmidt, R. (2012). LCAT, HDL cholesterol and ischemic cardiovascular disease: a Mendelian randomization study of HDL cholesterol in 54,500 individuals. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 97(2), E248–56.
- Hammad, S. M., Stefansson, S., Twal, W. O., Drake, C. J., Fleming, P., Remaley, a, ... Argraves, W. S. (1999). Cubilin, the endocytic receptor for intrinsic factor-vitamin B(12) complex, mediates high-density lipoprotein holoparticle endocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(18), 10158–63.

- Han, R., Lai, R., Ding, Q., Wang, Z., Luo, X., Zhang, Y., ... Chen, Y. (2007). Apolipoprotein A-I stimulates AMP-activated protein kinase and improves glucose metabolism. *Diabetologia*, 50(9), 1960–8.
- Hannan, A. J. (2010). Tandem repeat polymorphisms: modulators of disease susceptibility and candidates for “missing heritability”. *Trends in genetics : TIG*, 26(2), 59–65.
- Harrison, S. C., Holmes, M. V., & Humphries, S. E. (2012). Mendelian randomisation, lipids, and cardiovascular disease. *Lancet*, 380(9841), 543–5.
- Hayek, S., Canepa Escaro, F., Sattar, A., Gamalski, S., Wells, K. E., Divine, G., ... Williams, L. K. (2013). Effect of ezetimibe on major atherosclerotic disease events and all-cause mortality. *The American journal of cardiology*, 111(4), 532–9.
- Hayhurst, G. P., Lee, Y., Lambert, G., Ward, J. M., & Gonzalez, F. J. (2001). Hepatocyte Nuclear Factor 4 α (nuclear receptor 2A1) is essential for maintenance of hepatic gene expression and lipid homeostasis. *Molecular and Cellular Biology*, 21(4), 1393–1403.
- HDL forum. (n.d.). High-density lipoprotein and inflammation - new insights. Retrieved October 25, 2013, from <http://www.hdlforum.org/ask-the-expert/viewpoints/260-high-density-lipoprotein-and-inflammation-new-insights>
- Heid, I. M., Boes, E., Müller, M., Kollerits, B., Lamina, C., Coassin, S., ... Kronenberg, F. (2008). Genome-wide association analysis of high-density lipoprotein cholesterol in the population-based KORA study sheds new light on intergenic regions. *Circulation. Cardiovascular genetics*, 1(1), 10–20.
- Hildebrand, R. B., Lammers, B., Meurs, I., Korpelaar, S. J. a, De Haan, W., Zhao, Y., ... Van Eck, M. (2010). Restoration of high-density lipoprotein levels by cholesteryl ester transfer protein expression in scavenger receptor class B type I (SR-BI) knockout mice does not normalize pathologies associated with SR-BI deficiency. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 30(7), 1439–45.
- Hirano, K, Yamashita, S., & Matsuzawa, Y. (2000). Pros and cons of inhibiting cholesteryl ester transfer protein. *Current opinion in lipidology*, 11(6), 589–96.
- Hirano, Ken-ichi, Yamashita, S., Nakajima, N., Arai, T., Maruyama, T., Yoshida, Y., ... Matsuzawa, Y. (1997). Genetic cholesteryl ester transfer protein deficiency is extremely frequent in the Omagari area of Japan. Marked hyperalphalipoproteinemia caused by CETP gene mutation is not associated with longevity. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 17, 1053–1059.
- Hobbs, H. H., & Rader, D. J. (1999). ABC1 : connecting yellow tonsils , neuropathy , and very low HDL. *The Journal of clinical investigation*, 104(8), 1015–1017.
- Holvoet, P., Mertens, a., Verhamme, P., Bogaerts, K., Beyens, G., Verhaeghe, R., ... Van de Werf, F. (2001). Circulating Oxidized LDL Is a Useful Marker for Identifying Patients With

- Coronary Artery Disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 21(5), 844–848.
- Hoover-Plow, J., & Huang, M. (2013). Lipoprotein(a) metabolism: potential sites for therapeutic targets. *Metabolism: clinical and experimental*, 62(4), 479–91.
- Horton, J. D., Goldstein, J. L., & Brown, M. S. (2002). Critical review SREBPs : activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *Journal of Clinical Investigation*, 109(9), 1125–1131.
- Hossain, M., Tsujita, M., Gonzalez, F., & Yokoyama, S. (2008). Effects of fibrate drugs on expression of ABCA1 and HDL biogenesis in hepatocytes. *Journal of cardiovascular pharmacology*, 51(3), 258–266.
- Huang, W., Sasaki, J., Matsunaga, a., Nanimatsu, H., Moriyama, K., Han, H., ... Arakawa, K. (1998). A Novel Homozygous Missense Mutation in the Apo A-I Gene With Apo A-I Deficiency. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 18(3), 389–396.
- Hughes, M. F., Saarela, O., Stritzke, J., Kee, F., Silander, K., Klopp, N., ... Schunkert, H. (2012). Genetic markers enhance coronary risk prediction in men: the MORGAM prospective cohorts. *PloS one*, 7(7), e40922.
- Human Genome Project Information, W. (n.d.). Comparaison des génomes de la souris et de l'homme. Retrieved from http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/faq/compngen.shtml
- Huuskonen, J., Olkkonen, V. M., Jauhiainen, M., & Ehnholm, C. (2001). The impact of phospholipid transfer protein (PLTP) on HDL metabolism. *Atherosclerosis*, 155(2), 269–81.
- Insull, W. J. (2006). Clinical utility of bile acid sequestrants in the treatment of dyslipidemia: a scientific review. *Southern medical journal*, 99(3), 257–273.
- Isaacs, A., Sayed-Tabatabaei, F. a, Njajou, O. T., Witteman, J. C. M., & van Duijn, C. M. (2004). The -514 C->T hepatic lipase promoter region polymorphism and plasma lipids: a meta-analysis. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 89(8), 3858–63.
- Jacquet, S., Malaval, C., Martinez, L., Sak, K., Rolland, C., Perez, C., ... Barbaras, R. (2005). The nucleotide receptor P2Y13 is a key regulator of hepatic high-density lipoprotein (HDL) endocytosis. *Cellular and molecular life sciences*, 62(21), 2508–2515.
- Jansen, H. (2002). Hepatic lipase: a pro- or anti-atherogenic protein? *The Journal of Lipid Research*, 43(9), 1352–1362.
- Ji, Y. (1997). Scavenger Receptor BI Promotes High Density Lipoprotein-mediated Cellular Cholesterol Efflux. *Journal of Biological Chemistry*, 272(34), 20982–20985.

- Jin, W., Marchadier, D., & Rader, D. J. (2002). Lipases and HDL metabolism. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 13(4), 174–8.
- Joy, T., & Hegele, R. a. (2008). Is raising HDL a futile strategy for atheroprotection? *Nature reviews. Drug discovery*, 7(2), 143–55.
- Joy, T. R. (2012). Novel therapeutic agents for lowering low density lipoprotein cholesterol. *Pharmacology & therapeutics*, 135(1), 31–43.
- Kaess, B. M., Tomaszewski, M., Braund, P. S., Stark, K., Rafelt, S., Fischer, M., ... Samani, N. J. (2011). Large-scale candidate gene analysis of HDL particle features. *PloS one*, 6(1), e14529.
- Kalogirou, M., Tsimihodimos, V., & Elisaf, M. (2010). Pleiotropic effects of ezetimibe: do they really exist? *European journal of pharmacology*, 633(1-3), 62–70.
- Kamstrup, P. R., Tybjaerg-Hansen, A., Steffensen, R., & Nordestgaard, B. G. (2008). Pentanucleotide repeat polymorphism, lipoprotein(a) levels, and risk of ischemic heart disease. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 93(10), 3769–76.
- Kastelein, J. J. P., Wedel, M. K., Baker, B. F., Su, J., Bradley, J. D., Yu, R. Z., ... Crooke, R. M. (2006). Potent reduction of apolipoprotein B and low-density lipoprotein cholesterol by short-term administration of an antisense inhibitor of apolipoprotein B. *Circulation*, 114(16), 1729–35.
- Kathiresan, S., Melander, O., Guiducci, C., Surti, A., Burt, N. P., Rieder, M. J., ... Orho-Melander, M. (2008). Six new loci associated with blood low-density lipoprotein cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol or triglycerides in humans. *Nature genetics*, 40(2), 189–97.
- Kathiresan, S., Voight, B. F., Purcell, S., Musunuru, K., Ardissino, D., Mannucci, P. M., ... Schunkert, H. (2009). Genome-wide association of early-onset myocardial infarction with single nucleotide polymorphisms and copy number variants. *Nature genetics*, 41(3), 334–41.
- Keech, a, Simes, R. J., Barter, P., Best, J., Scott, R., Taskinen, M. R., ... Laakso, M. (2005). Effects of long-term fenofibrate therapy on cardiovascular events in 9795 people with type 2 diabetes mellitus (the FIELD study): randomised controlled trial. *Lancet*, 366(9500), 1849–61.
- Kettunen, J., Tukiainen, T., Sarin, A.-P., Ortega-Alonso, A., Tikkanen, E., Lyytikäinen, L.-P., ... Ripatti, S. (2012). Genome-wide association study identifies multiple loci influencing human serum metabolite levels. *Nature genetics*, 44(3), 269–76.
- Kimura, T., Sato, K., Malchinkhuu, E., Tomura, H., Tamama, K., Kuwabara, A., ... Okajima, F. (2003). High-density lipoprotein stimulates endothelial cell migration and survival through sphingosine 1-phosphate and its receptors. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 23(7), 1283–8.

- Kimura, T., Tomura, H., Mogi, C., Kuwabara, A., Damirin, A., Ishizuka, T., ... Okajima, F. (2006). Role of scavenger receptor class B type I and sphingosine 1-phosphate receptors in high density lipoprotein-induced inhibition of adhesion molecule expression in endothelial cells. *The Journal of biological chemistry*, 281(49), 37457–67.
- Klerkx, A. H. E. M., El Harchaoui, K., van der Steeg, W. a, Boekholdt, S. M., Strokes, E. S. G., Kastelein, J. J. P., & Kuivenhoven, J. A. (2006). Cholesteryl ester transfer protein (CETP) inhibition beyond raising high-density lipoprotein cholesterol levels: pathways by which modulation of CETP activity may alter atherogenesis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 26(4), 706–15.
- Knowles, J. W., Assimes, T. L., Kiernan, M., Pavlovic, A., Goldstein, B. a, Yank, V., ... Ioannidis, J. P. a. (2012). Randomized trial of personal genomics for preventive cardiology: design and challenges. *Circulation. Cardiovascular genetics*, 5(3), 368–76.
- Kobayashi, K., Yamanaka, H., Yanamoto, F., Okubo, M., & Noguchi, K. (2012). Multiple P2Y subtypes in spinal microglia are involved in neuropathic pain after peripheral nerve injury. *Glia*, 60(10), 1529–39.
- Kontush, A., & Chapman, M. J. (2006). Functionally defective high-density lipoprotein : a new therapeutic target at the crossroads of dyslipidemia , inflammation , and atherosclerosis. *Pharmacological Reviews*, 58(3), 342–374.
- Kovsan, J., Blüher, M., Tarnovskii, T., Klöting, N., Kirshtein, B., Madar, L., ... Rudich, A. (2011). Altered autophagy in human adipose tissues in obesity. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 96(2), E268–77.
- Kozarsky, K. F., Donahee, M. H., Rigotti, A., Iqbal, S. N., Edelman, E. R., & Krieger, M. (1997). Overexpression of the HDL receptor SR-BI alters plasma HDL and bile cholesterol levels. *Nature*, 387, 414–417.
- Kozyraki, R., Fyfe, J., Kristiansen, M., Gerdes, C., Jacobsen, C., Cui, S., ... Moestrup, S. K. (1999). The intrinsic factor-vitamin B12 receptor, cubilin, is a high-affinity apolipoprotein A-I receptor facilitating endocytosis of high-density lipoprotein. *Nature medicine*, 5(6), 656–61.
- Kral, B. G., & Becker, D. M. (2007). Familial occurrence of abnormalities of high-density lipoprotein cholesterol. *Journal of clinical lipidology*, 1(1), 31–40.
- Kruit, J. K., Wijesekara, N., Westwell-Roper, C., Vanmierlo, T., de Haan, W., Bhattacharjee, A., ... Hayden, M. R. (2012). Loss of both ABCA1 and ABCG1 results in increased disturbances in islet sterol homeostasis, inflammation, and impaired β -cell function. *Diabetes*, 61(3), 659–64.
- Ku, C. S., Loy, E. Y., Salim, A., Pawitan, Y., & Chia, K. S. (2010). The discovery of human genetic variations and their use as disease markers: past, present and future. *Journal of human genetics*, 55(7), 403–15.

- Kunnen, S., & Van Eck, M. (2012). Lecithin:cholesterol acyltransferase: old friend or foe in atherosclerosis? *Journal of lipid research*, 53(9), 1783–99.
- Lanktree, M. B., & Hegele, R. a. (2009). Gene-gene and gene-environment interactions: new insights into the prevention, detection and management of coronary artery disease. *Genome medicine*, 1(2), 28.
- Lee, J.-Y., & Parks, J. S. (2005). ATP-binding cassette transporter AI and its role in HDL formation. *Current opinion in lipidology*, 16(1), 19–25.
- Léoni, J. (2001). *Physiopathologie de l'athérosclérose. Mécanisme et prévention de l'athéromatose*. Université de Franche-Comté. Retrieved from <http://www.123bio.net/revues/jleoni/1chap2.html>
- Lewis, G. F., & Rader, D. J. (2005). New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. *Circulation research*, 96(12), 1221–32.
- Li, X.-A., Guo, L., Dressman, J. L., Asmis, R., & Smart, E. J. (2005). A novel ligand-independent apoptotic pathway induced by scavenger receptor class B, type I and suppressed by endothelial nitric-oxide synthase and high density lipoprotein. *The Journal of biological chemistry*, 280(19), 19087–96.
- Li, Y., Dong, J.-B., & Wu, M.-P. (2008). Human ApoA-I overexpression diminishes LPS-induced systemic inflammation and multiple organ damage in mice. *European journal of pharmacology*, 590(1-3), 417–22.
- Libby, P. (2012). Inflammation in atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 32(9), 2045–51.
- Lièvre, M., & Cucherat, M. (2006). Les statines : données factuelles 2005 (n°2). *Médecine*, 2(2), 58–62.
- Liu, M., & Subbaiah, P. V. (1994). Hydrolysis and transesterification of platelet-activating factor by lecithin-cholesterol acyltransferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(13), 6035–9.
- Lohman, A. W., Billaud, M., & Isakson, B. E. (2012). Mechanisms of ATP release and signalling in the blood vessel wall. *Cardiovascular research*, 95(3), 269–80.
- Luc, G. (2002). Mécanismes d'action des fibrates et des statines : quelles nouveautés ? *Médecine Thérapeutique Endocrinologie & Reproduction*, 4(4-5), 232–238.
- Magee, G., & Sharpe, P. C. (2009). Paradoxical decreases in high-density lipoprotein cholesterol with fenofibrate: a quite common phenomenon. *Journal of clinical pathology*, 62(3), 250–3.

- Malaguarnera, M., Vacante, M., Russo, C., Malaguarnera, G., Antic, T., Malaguarnera, L., ... Frigiola, A. (2013). Lipoprotein(a) in cardiovascular diseases. *BioMed research international*, 2013, 650989.
- Malaval, C. (2008). *Régulation de la captation hépatique des HDL : la voie F1-ATPase/P2Y13. De la caractérisation cellulaire au modèle animal*. Thèse de l'Université Paul Sabatier, Toulouse III.
- Malaval, C., Laffargue, M., Barbaras, R., Rolland, C., Peres, C., Champagne, E., ... Martinez, L. O. (2009). RhoA/ROCK I signalling downstream of the P2Y13 ADP-receptor controls HDL endocytosis in human hepatocytes. *Cellular signalling*, 21(1), 120–7.
- Malin, S. a, & Molliver, D. C. (2010). Gi- and Gq-coupled ADP (P2Y) receptors act in opposition to modulate nociceptive signaling and inflammatory pain behavior. *Molecular pain*, 6, 21.
- Mallika, V., Goswami, B., & Rajappa, M. (2007). Atherosclerosis pathophysiology and the role of novel risk factors: a clinicobiochemical perspective. *Angiology*, 58(5), 513–22.
- Mardones, P., Quiñones, V., Amigo, L., Moreno, M., Miquel, J. F., Schwarz, M., ... Rigotti, a. (2001). Hepatic cholesterol and bile acid metabolism and intestinal cholesterol absorption in scavenger receptor class B type I-deficient mice. *Journal of lipid research*, 42(2), 170–80.
- Marian, a J., & Belmont, J. (2011). Strategic approaches to unraveling genetic causes of cardiovascular diseases. *Circulation research*, 108(10), 1252–69.
- Marian, A. J. (2012). Elements of “missing heritability”. *Current opinion in cardiology*, 27(3), 197–201.
- Marques-Vidal, P., Azéma, C., Collet, X., Vieu, C., Chap, H., & Perret, B. (1994). Hepatic lipase promotes the uptake of HDL esterified cholesterol by the perfused rat liver: a study using reconstituted HDL particles of defined phospholipid composition. *Journal of lipid research*, 35(3), 373–84.
- Martin, G., Duez, H., Blanquart, C., Berezowski, V., Poulain, P., Fruchart, J., ... Staels, B. (2001). Statin-induced inhibition of the Rho-signaling pathway activates PPAR α and induces HDL apoA-I. *The Journal of clinical investigation*, 107(11), 1423–1432.
- Martinez, L., Jacquet, S., Tercé, F., Collet, X., Perret, B., & Barbaras, R. (2004). New insight on the molecular mechanisms of high-density lipoprotein cellular interactions. *Cellular and molecular life sciences*, 61(18), 2343–2360.
- Martinez, L. O., Cabou, C., Pons, V., & Malaval, C. (2012). P2Y receptors in atherosclerosis : from lipid metabolism to vascular. *WIREs Membrane Transport and Signaling*, 1–12.

- Martinez, L. O., Jacquet, S., Esteve, J.-P., Rolland, C., Cabezón, E., Champagne, E., ... Barbaras, R. (2003). Ectopic β -chain of ATP synthase is an apolipoprotein A-I receptor in hepatic HDL endocytosis. *Nature*, 421(January), 75–79.
- Matsumoto, T., Kobayashi, T., & Kamata, K. (2007). Role of lysophosphatidylcholine (LPC) in atherosclerosis. *Current Medicinal Chemistry*, 14, 3209–3220.
- Maugeais, C., Tietge, U. J. F., Broedl, U. C., Marchadier, D., Cain, W., McCoy, M. G., ... Rader, D. J. (2003). Dose-dependent acceleration of high-density lipoprotein catabolism by endothelial lipase. *Circulation*, 108(17), 2121–6.
- Mead, J. R., Irvine, S. a, & Ramji, D. P. (2002). Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 80(12), 753–69.
- Michelson, A. D. (2007). *Platelets (second edition)*. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/book/9780123693679>
- Mineo, C., Deguchi, H., Griffin, J. H., & Shaul, P. W. (2006). Endothelial and antithrombotic actions of HDL. *Circulation research*, 98(11), 1352–64.
- Mineo, C., & Shaul, P. W. (2012a). Functions of scavenger receptor class B, type I in atherosclerosis. *Current opinion in lipidology*, 23(5), 487–93.
- Mineo, C., & Shaul, P. W. (2012b). Novel biological functions of high-density lipoprotein cholesterol. *Circulation research*, 111(8), 1079–90.
- Moestrup, S. K., & Kozyraki, R. (2000). Cubilin, a high-density lipoprotein receptor. *Current opinion in lipidology*, 11(2), 133–40.
- Murphy, A. J., Woollard, K. J., Hoang, A., Mukhamedova, N., Stirzaker, R. a, McCormick, S. P. a, ... Chin-Dusting, J. (2008). High-density lipoprotein reduces the human monocyte inflammatory response. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 28(11), 2071–7.
- Murphy, A. J., Woollard, K. J., Suhartoyo, A., Stirzaker, R. a, Shaw, J., Sviridov, D., & Chin-Dusting, J. P. F. (2011). Neutrophil activation is attenuated by high-density lipoprotein and apolipoprotein A-I in in vitro and in vivo models of inflammation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 31(6), 1333–41.
- Murphy, C., Murray, A. M., Meaney, S., & Gåfvels, M. (2007). Regulation by SREBP-2 defines a potential link between isoprenoid and adenosylcobalamin metabolism. *Biochemical and biophysical research communications*, 355(2), 359–64.
- Musunuru, K., & Kathiresan, S. (2008). HapMap and mapping genes for cardiovascular disease. *Circulation. Cardiovascular genetics*, 1(1), 66–71.

- Myocardial Infarction Genetics Consortium. (2009). Genome-wide association of early-onset myocardial infarction with single nucleotide polymorphisms and copy number variants. *Nature genetics*, 41(3), 334–342.
- Nagao, K., Kimura, Y., Mastuo, M., & Ueda, K. (2010). Lipid outward translocation by ABC proteins. *FEBS letters*, 584(13), 2717–23.
- Nakamura, Y. (2009). DNA variations in human and medical genetics: 25 years of my experience. *Journal of human genetics*, 54(1), 1–8.
- National Human Genome Research Institute. (2013). Catalogue de GWAS. *National Institute of Health*. Retrieved August 04, 2013, from <http://www.genome.gov/26525384>
- Navab, M., Hama, S. Y., Cooke, C. J., Anantharamaiah, G. M., Chaddha, M., Jin, L., ... Fogelman, a M. (2000). Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: step 1. *Journal of lipid research*, 41(9), 1481–94.
- Newman, a. B., Shemanski, L., Manolio, T. a., Cushman, M., Mittelmark, M., Polak, J. F., ... Siscovick, D. (1999). Ankle-Arm Index as a Predictor of Cardiovascular Disease and Mortality in the Cardiovascular Health Study. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 19(3), 538–545.
- Ng, P. C., & Henikoff, S. (2001). Predicting deleterious amino acid substitutions. *Genome research*, 863–874.
- Nicholls, S. J., Tuzcu, E. M., Sipahi, I., Grasso, A. W., Schoenhagen, P., Hu, T., ... Nissen, S. E. (2007). Statins, high-density lipoprotein cholesterol, and regression of coronary atherosclerosis. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, 297(5), 499–508.
- Nijstad, N., Wiersma, H., Gautier, T., van der Giet, M., Maugeais, C., & Tietge, U. J. F. (2009). Scavenger receptor BI-mediated selective uptake is required for the remodeling of high density lipoprotein by endothelial lipase. *The Journal of biological chemistry*, 284(10), 6093–100.
- Nock, N. L., & Chandran Pillai, A. L. P. (2009). *Dyslipidemia : genetics and role in the metabolic syndrome* (pp. 93–126). Retrieved from www.intechopen.com
- Nofer, J., Kehrel, B., Fobker, M., Levkau, B., Assman, G., & von Eckardstein, A. (2002). HDL and arteriosclerosis : beyond reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis*, 161(1), 1–16.
- Nofer, J. R., Levkau, B., Wolinska, I., Junker, R., Fobker, M., von Eckardstein, a, ... Assmann, G. (2001). Suppression of endothelial cell apoptosis by high density lipoproteins (HDL) and HDL-associated lysosphingolipids. *The Journal of biological chemistry*, 276(37), 34480–5.

- Norata, G. D., Pirillo, A., Ammirati, E., & Catapano, A. L. (2012). Emerging role of high density lipoproteins as a player in the immune system. *Atherosclerosis*, 220(1), 11–21.
- O, K., Hill, J. S., Wang, X., McLeod, R., & Pritchard, P. H. (1993). Lecithin:cholesterol acyltransferase: role of N-linked glycosylation in enzyme function. *The Biochemical journal*, 294, 879–84.
- Okajima, F., Sato, K., & Kimura, T. (2009). Anti-atherogenic actions of high-density lipoprotein through sphingosine 1-phosphate receptors and scavenger receptor class B type I. *Endocrine journal*, 56(3), 317–34.
- OMS/WHO. (2013). Cardiovascular diseases (CVD), fact sheet n°317. Retrieved from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/index.html>
- Oram, J. F., & Heinecke, J. W. (2005). ATP-Binding Cassette Transporter A1 : a cell cholesterol exporter that protects against cardiovascular disease. *Physiological reviews*, 85, 1343–1372.
- Oram, J. F., & Vaughan, A. M. (2006). ATP-Binding cassette cholesterol transporters and cardiovascular disease. *Circulation research*, 99(10), 1031–43.
- Osanai, T., Magota, K., & Okumura, K. (2009). Coupling factor 6 as a novel vasoactive and proatherogenic peptide in vascular endothelial cells. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 380(3), 205–14.
- Ouimet, M., & Moore, K. J. (2013). A big role for small RNAs in HDL homeostasis. *Journal of lipid research*, 54(5), 1161–7.
- Patel, A. Y., Pillarisetti, J., Marr, J., & Vacek, J. L. (2013). Ezetimibe in combination with a statin does not reduce all-cause mortality. *Journal of clinical medicine research*, 5(4), 275–80.
- Patel, R. S., Sun, Y. V, Hartiala, J., Veledar, E., Su, S., Sher, S., ... Quyyumi, A. a. (2012). Association of a genetic risk score with prevalent and incident myocardial infarction in subjects undergoing coronary angiography. *Circulation. Cardiovascular genetics*, 5(4), 441–9.
- Pearson, T. a, & Manolio, T. a. (2008). How to interpret a genome-wide association study. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, 299(11), 1335–44.
- Peden, J. F., & Farrall, M. (2011). Thirty-five common variants for coronary artery disease: the fruits of much collaborative labour. *Human molecular genetics*, 20(R2), R198–205.
- Perret, B., Fabre, A., Genoux, A., Malaval, C., Radojkovic, C., Tercé, F., ... Martinez, L. (2007). HDL : mécanismes des effets athéroprotecteurs et cibles pharmacologiques d'avenir. *La lettre de la NSFA*.

- Petersen, A.-K., Stark, K., Musameh, M. D., Nelson, C. P., Römisch-Margl, W., Kremer, W., ... Kastenmüller, G. (2012). Genetic associations with lipoprotein subfractions provide information on their biological nature. *Human molecular genetics*, 21(6), 1433–43.
- Pétrémand, J., Puyal, J., Chatton, J.-Y., Duprez, J., Allagnat, F., Frias, M., ... Widmann, C. (2012). HDLs protect pancreatic β -cells against ER stress by restoring protein folding and trafficking. *Diabetes*, 61(5), 1100–11.
- Petrides, F., Shearston, K., Chatelais, M., Guilbaud, F., Meilhac, O., & Lambert, G. (2013). The promises of PCSK9 inhibition. *Current opinion in lipidology*, 24(4), 307–12.
- Poirier, S., & Mayer, G. (2013). The biology of PCSK9 from the endoplasmic reticulum to lysosomes: new and emerging therapeutics to control low-density lipoprotein cholesterol. *Drug design, development and therapy*, 7, 1135–1148.
- Pollex, R. L., & Hegele, R. a. (2007). Copy number variation in the human genome and its implications for cardiovascular disease. *Circulation*, 115(24), 3130–8.
- Pramfalk, C., Jiang, Z.-Y., & Parini, P. (2011). Hepatic Niemann-Pick C1-like 1. *Current opinion in lipidology*, 22(3), 225–30.
- Preuss, M., König, I. R., Thompson, J. R., Erdmann, J., Absher, D., Assimes, T. L., ... Schunkert, H. (2010). Design of the Coronary ARtery Disease Genome-Wide Replication And Meta-Analysis (CARDIoGRAM) Study: A Genome-wide association meta-analysis involving more than 22 000 cases and 60 000 controls. *Circulation. Cardiovascular genetics*, 3(5), 475–83.
- Prins, B. P., Lagou, V., Asselbergs, F. W., Snieder, H., & Fu, J. (2012). Genetics of coronary artery disease: genome-wide association studies and beyond. *Atherosclerosis*, 225(1), 1–10.
- Qu, S., Fan, H., Blanco-Vaca, F., & Pownall, H. (1993). Effects of site-directed mutagenesis on the N-glycosylation sites of human lecithin:cholesterol acyltransferase. *Biochemistry*, 32(34), 8732–8736.
- Rader, D. J. (2006). Molecular regulation of HDL metabolism and function : implications for novel therapies. *The Journal of clinical investigation*, 116(12), 3090–3100.
- Rader, D. J., & DeGoma, E. (2012). Approach to the patient with extremely low HDL-cholesterol. *journal of clinical and endocrinology metabolism*, 97(10), 3399–3407.
- Radojkovic, C., Genoux, A., Pons, V., Combes, G., de Jonge, H., Champagne, E., ... Martinez, L. O. (2009). Stimulation of cell surface F1-ATPase activity by apolipoprotein A-I inhibits endothelial cell apoptosis and promotes proliferation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 29(7), 1125–30.
- Ramensky, V., Bork, P., & Sunyaev, S. (2002). Human non-synonymous SNPs: server and survey. *Nucleic acids research*, 30(17), 3894–900.

- Rämet, M. E., Rämet, M., Lu, Q., Nickerson, M., Savolainen, M. J., Malzone, A., & Karas, R. H. (2003). High-density lipoprotein increases the abundance of eNOS protein in human vascular endothelial cells by increasing its half-life. *Journal of the American College of Cardiology*, 41(12), 2288–2297.
- Rao, R., Albers, J. J., Wolfbauer, G., & Pownall, H. J. (1997). Molecular and macromolecular specificity of human plasma phospholipid transfer protein. *Biochemistry*, 36(12), 3645–53.
- Razzaghi, H., Santorico, S. a, & Kamboh, M. I. (2012). Population-Based Resequencing of LIPG and ZNF202 Genes in Subjects with Extreme HDL Levels. *Frontiers in genetics*, 3(June), 89.
- Recos Vidal. Dyslipidémies. Retrieved July 27, 2013, from <http://corp.vidal.fr/les-produits-professionnels/vidal-recos>
- Redon, R., Ishikawa, S., Fitch, K. R., Feuk, L., Perry, G. H., Andrews, T. D., ... Hurles, M. E. (2006). Global variation in copy number in the human genome. *Nature*, 444(7118), 444–54.
- Rezaee, F., Casetta, B., Levels, J. H. M., Speijer, D., & Meijers, J. C. M. (2006). Proteomic analysis of high-density lipoprotein. *Proteomics*, 6(2), 721–30.
- Ribas, V., Sánchez-Quesada, J. L., Antón, R., Camacho, M., Julve, J., Escolà-Gil, J. C., ... Blanco-Vaca, F. (2004). Human apolipoprotein A-II enrichment displaces paraoxonase from HDL and impairs its antioxidant properties: a new mechanism linking HDL protein composition and antiatherogenic potential. *Circulation research*, 95(8), 789–97.
- Richardson, K., Lai, C.-Q., Parnell, L. D., Lee, Y.-C., & Ordovas, J. M. (2011). A genome-wide survey for SNPs altering microRNA seed sites identifies functional candidates in GWAS. *BMC genomics*, 12, 504.
- Ridker, P. M., Paré, G., Parker, A. N., Zee, R. Y. L., Miletich, J. P., & Chasman, D. I. (2009). Polymorphism in the CETP gene region, HDL cholesterol, and risk of future myocardial infarction: Genomewide analysis among 18 245 initially healthy women from the Women's Genome Health Study. *Circulation. Cardiovascular genetics*, 2(1), 26–33.
- Rigotti, a, Trigatti, B. L., Penman, M., Rayburn, H., Herz, J., & Krieger, M. (1997). A targeted mutation in the murine gene encoding the high density lipoprotein (HDL) receptor scavenger receptor class B type I reveals its key role in HDL metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(23), 12610–5.
- Ripatti, S., Tikkanen, E., Orho-Melander, M., Havulinna, A. S., Silander, K., Sharma, A., ... Kathiresan, S. (2010). A multilocus genetic risk score for coronary heart disease: case-control and prospective cohort analyses. *Lancet*, 376(9750), 1393–400.

- Roberts, R., Wells, G. a, Stewart, A. F. R., Dandona, S., & Chen, L. (2010). The genome-wide association study--a new era for common polygenic disorders. *Journal of cardiovascular translational research*, 3(3), 173–82.
- Rong, J. X., Li, J., Reis, E. D., Choudhury, R. P., Dansky, H. M., Elmaleh, V. I., ... Fisher, E. a. (2001). Elevating High-Density Lipoprotein Cholesterol in Apolipoprotein E-Deficient Mice Remodels Advanced Atherosclerotic Lesions by Decreasing Macrophage and Increasing Smooth Muscle Cell Content. *Circulation*, 104(20), 2447–2452.
- Rosenfeld, M. E., & Campbell, L. a. (2011). Pathogens and atherosclerosis: update on the potential contribution of multiple infectious organisms to the pathogenesis of atherosclerosis. *Thrombosis and haemostasis*, 106(5), 858–67.
- Rosenfeld, S. I., Packman, C. H., & Leddy, J. P. (1983). Inhibition of the lytic action of cell-bound terminal complement components by human high density lipoproteins and apoproteins. *The Journal of clinical investigation*, 71(4), 795–808.
- Rosenson, R. S., Brewer, H. B., Chapman, M. J., Fazio, S., Hussain, M. M., Kontush, A., ... Schaefer, E. J. (2011). HDL measures, particle heterogeneity, proposed nomenclature, and relation to atherosclerotic cardiovascular events. *Clinical chemistry*, 57(3), 392–410.
- Ruan, X., Li, Z., Zhang, Y., Yang, L., Pan, Y., Wang, Z., ... Chen, Y. (2011). Apolipoprotein A-I possesses an anti-obesity effect associated with increase of energy expenditure and up-regulation of UCP1 in brown fat. *Journal of cellular and molecular medicine*, 15(4), 763–72.
- Rung, J., Cauchi, S., Albrechtsen, A., Shen, L., Rocheleau, G., Cavalcanti-Proença, C., ... Sladek, R. (2009). Genetic variant near IRS1 is associated with type 2 diabetes, insulin resistance and hyperinsulinemia. *Nature genetics*, 41(10), 1110–5.
- Sabatti, C., Service, S. K., Hartikainen, A.-L., Pouta, A., Ripatti, S., Brodsky, J., ... Peltonen, L. (2009). Genome-wide association analysis of metabolic traits in a birth cohort from a founder population. *Nature genetics*, 41(1), 35–46.
- Samani, N. J., Erdmann, J., Hall, A. S., Hengstenberg, C., Mangino, M., Mayer, B., ... Schunkert, H. (2007). Genomewide association analysis of coronary artery disease. *The New England Journal of Medicine*, 357(5), 443–453.
- Sanders, A. E., Wang, C., Katz, M., Derby, C. A., Barzilai, N., Ozelius, L., & Lipton, R. B. (2010). Association of a functional polymorphism in the cholesteryl ester transfer protein (CETP) gene with memory decline and incidence of dementia. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, 303(2), 150–158.
- Sato, R. (2010). Sterol metabolism and SREBP activation. *Archives of biochemistry and biophysics*, 501(2), 177–81.
- Sauna, Z. E., & Kimchi-Sarfaty, C. (2011). Understanding the contribution of synonymous mutations to human disease. *Nature reviews. Genetics*, 12(10), 683–91.

- Sauter, G., Berr, F., Beuers, U., Fischer, S., & Paumgartner, G. (1996). Serum concentrations of 7 α -hydroxy-4-cholesten-3-one reflect bile acid synthesis in humans. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 24(1), 123–6.
- Savel, J., Lafitte, M., Pucheu, Y., Pradeau, V., Tabarin, A., & Couffignal, T. (2012). Very low levels of HDL cholesterol and atherosclerosis, a variable relationship--a review of LCAT deficiency. *Vascular health and risk management*, 8, 357–61.
- Schaefer, E. J., Santos, R. D., & Asztalos, B. F. (2010). Marked HDL deficiency and premature coronary heart disease. *Current opinion in lipidology*, 21(4), 289–97.
- Schindler, P. a, Settineri, C. a, Collet, X., Fielding, C. J., & Burlingame, a L. (1995). Site-specific detection and structural characterization of the glycosylation of human plasma proteins lecithin:cholesterol acyltransferase and apolipoprotein D using HPLC/electrospray mass spectrometry and sequential glycosidase digestion. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 4(4), 791–803.
- Schnabel, R. B., Baccarelli, A., Lin, H., Ellinor, P. T., & Benjamin, E. J. (2012). Next steps in cardiovascular disease genomic research--sequencing, epigenetics, and transcriptomics. *Clinical chemistry*, 58(1), 113–26.
- Schunkert, H., König, I. R., Kathiresan, S., Reilly, M. P., Assimes, T. L., Holm, H., ... Gieger, C. (2011). Large-scale association analysis identifies 13 new susceptibility loci for coronary artery disease. *Nature genetics*, 43(4), 333–8.
- Schwartz, C. C., VandenBroek, J. M., & Cooper, P. S. (2004). Lipoprotein cholesteryl ester production, transfer, and output in vivo in humans. *Journal of lipid research*, 45(9), 1594–607.
- Serhan, N., Cabou, C., Verdier, C., Lichtenstein, L., Malet, N., Perret, B., ... Martinez, L. O. (2013). Chronic pharmacological activation of P2Y₁₃ receptor in mice decreases HDL-cholesterol level by increasing hepatic HDL uptake and bile acid secretion. *Biochimica et biophysica acta*, 1831(4), 719–25.
- Shah, A. S., Tan, L., Long, J. L., & Davidson, W. S. (2013). Proteomic diversity of high density lipoproteins: our emerging understanding of its importance in lipid transport and beyond. *Journal of lipid research*, 54(10), 2575–85.
- Shih, D. M., Gu, L., Xia, Y. R., Navab, M., Li, W. F., Hama, S., ... Lusis, a J. (1998). Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. *Nature*, 394(6690), 284–7.
- Soyal, S. M., Sandhofer, A., Hahne, P., Oberkofler, H., Felder, T., Iglseder, B., ... Patsch, W. (2011). Cholesteryl ester transfer protein and hepatic lipase gene polymorphisms : Effects on hepatic mRNA levels , plasma lipids and carotid atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 216, 374–380.

- Stanislovaitiene, D., Lesauskaite, V., Zaliuniene, D., Smalinskiene, A., Gustiene, O., Zaliaduonyte-Peksiene, D., ... Zaliunas, R. (2013). SCARB1 single nucleotide polymorphism (rs5888) is associated with serum lipid profile and myocardial infarction in an age- and gender-dependent manner. *Lipids in health and disease*, 12(1), 24.
- Stary, H. C., Chandler, B. A., Dinsmore, R. E., Fuster, V., Glagov, S., Insull, W. J., ... Wissler, R. W. (1995). A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. *Circulation*, 92, 1355–1374.
- Steiner, C., Holleboom, A. G., Karuna, R., Motazacker, M. M., Kuivenhoven, J. A., Frikke-Schmidt, R., ... Eckardstein, A. Von. (2012). Lipoprotein distribution and serum concentrations of 7 α -hydroxy-4-cholesten-3-one and bile acids: effects of monogenic disturbances in high-density lipoprotein metabolism. *Clinical science (London, England : 1979)*, 122(8), 385–96.
- Stene, M. C., Frikke-Schmidt, R., Nordestgaard, B. G., & Tybjaerg-Hansen, A. (2006). Zinc Finger Protein 202, genetic variation, and HDL cholesterol in the general population. *Journal of lipid research*, 47(5), 944–52.
- Storey, R. F. (2011). Pharmacology and clinical trials of reversibly-binding P2Y₁₂ inhibitors. *Thrombosis and haemostasis*, 105 Suppl , S75–81.
- Stylianou, I. M., Bauer, R. C., Reilly, M. P., & Rader, D. J. (2012). Genetic basis of atherosclerosis: insights from mice and humans. *Circulation research*, 110(2), 337–55.
- Suc, I., Escargueil-Blanc, I., Troly, M., Salvayre, R., & Nègre-Salvayre, A. (1997). HDL and apoA prevent cell death of endothelial cells induced by oxidized LDL. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 17(10), 2158–2166.
- Sugano, M., Tsuchida, K., & Makino, N. (2000). High-density lipoproteins protect endothelial cells from tumor necrosis factor- α -induced apoptosis. *Biochemical and biophysical research communications*, 272(3), 872–6.
- Sunyaev, S., Ramensky, V., Koch, I., Lathe, W., Kondrashov, a S., & Bork, P. (2001). Prediction of deleterious human alleles. *Human molecular genetics*, 10(6), 591–7.
- Sviridov, D. (2009). Maturation of apolipoprotein A-I: unrecognized health benefit or a forgotten rudiment? *Journal of lipid research*, 50(7), 1257–8.
- Tall, a R. (1993). Plasma cholesteryl ester transfer protein. *Journal of lipid research*, 34(8), 1255–74.
- Tamagaki, T., Sawada, S., Imamura, H., Tada, Y., Yamasaki, S., Toratani, a, ... Nakagawa, M. (1996). Effects of high-density lipoproteins on intracellular pH and proliferation of human vascular endothelial cells. *Atherosclerosis*, 123(1-2), 73–82.

- Tan, C., Salehi, A., Svensson, S., Olde, B., & Erlinge, D. (2010). ADP receptor P2Y₁₃ induce apoptosis in pancreatic beta-cells. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 67(3), 445–53.
- Tang, C., Liu, Y., Kessler, P. S., Vaughan, A. M., & Oram, J. F. (2009). The macrophage cholesterol exporter ABCA1 functions as an anti-inflammatory receptor. *The Journal of biological chemistry*, 284(47), 32336–43.
- Tedguy, A., & Chapman, M. J. (2004). Pathogenèse de l'athérosclérose : théories et mécanismes. *Site internet de la NSFA*.
- Temel, R. E., & Brown, J. M. (2012). Biliary and nonbiliary contributions to reverse cholesterol transport. *Current opinion in lipidology*, 23(2), 85–90.
- Terasaka, N., Westerterp, M., Koetsveld, J., Fernández-Hernando, C., Yvan-Charvet, L., Wang, N., ... Tall, A. R. (2010). ATP-binding cassette transporter G1 and high-density lipoprotein promote endothelial NO synthesis through a decrease in the interaction of caveolin-1 and endothelial NO synthase. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 30(11), 2219–25.
- Terra, S., Francone, O., Contant, C., Gao, X., Lewin, A., & TT, N. (2008). Efficacy and safety of a potent and selective peroxisome proliferator activated receptor alpha agonist in subjects with dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. *The American journal of cardiology*, 102(4), 434–439.
- Teslovich, T. M., Musunuru, K., Smith, A. V., Edmondson, A. C., Stylianou, I. M., Koseki, M., ... Willer, C. J. (2010). Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids. *Nature*, 466(7307), 707–13.
- Thanassoulis, G., Peloso, G. M., Pencina, M. J., Hoffmann, U., Fox, C. S., Cupples, L. A., ... O'Donnell, C. J. (2012). A genetic risk score is associated with incident cardiovascular disease and coronary artery calcium: the Framingham Heart Study. *Circulation. Cardiovascular genetics*, 5(1), 113–21.
- Thompson, J. F., Lira, M. E., Durham, L. K., Clark, R. W., Bamberger, M. J., & Milos, P. M. (2003). Polymorphisms in the CETP gene and association with CETP mass and HDL levels. *Atherosclerosis*, 167(2), 195–204.
- Thorburn, D. R., & Rahman, S. (2011, April). Mitochondrial DNA-Associated Leigh Syndrome and NARP. doi:10.2307/4072509
- Timmins, J. M., Lee, J., Boudyguina, E., Kluckman, K. D., Brunham, L. R., Mulya, A., ... Parks, J. S. (2005). Targeted inactivation of hepatic Abca1 causes profound hypoalphalipoproteinemia and kidney hypercatabolism of apoA-I. *The journal of clinical investigation*, 115(5), 1333–1342.
- Toborek, M., & Kaiser, S. (1999). Endothelial cell functions. Relationship to atherogenesis. *Basic research in cardiology*, 94(5), 295–314.

- Toth, P. P. (2013). Emerging LDL therapies: Mipomersen-antisense oligonucleotide therapy in the management of hypercholesterolemia. *Journal of clinical lipidology*, 7(3 Suppl), S6–10.
- Toussaint, J.-F., Jacob, M.-P., Lagrost, L., & Chapman, M. J. (2003). *L'Athérosclérose. Physiopathologie, diagnostics et thérapeutiques*. Masson.
- Ueda, Y. (1999). Lower Plasma Levels and Accelerated Clearance of High Density Lipoprotein (HDL) and Non-HDL Cholesterol in Scavenger Receptor Class B Type I Transgenic Mice. *Journal of Biological Chemistry*, 274(11), 7165–7171.
- Uittenbogaard, a. (2000). High Density Lipoprotein Prevents Oxidized Low Density Lipoprotein-induced Inhibition of Endothelial Nitric-oxide Synthase Localization and Activation in Caveolae. *Journal of Biological Chemistry*, 275(15), 11278–11283.
- Vaarhorst, A. a M., Lu, Y., Heijmans, B. T., Dollé, M. E. T., Böhringer, S., Putter, H., ... Slagboom, P. E. (2012). Literature-based genetic risk scores for coronary heart disease: the Cardiovascular Registry Maastricht (CAREMA) prospective cohort study. *Circulation. Cardiovascular genetics*, 5(2), 202–9.
- Vaisar, T., Pennathur, S., Green, P. S., Gharib, S. A., Hoofnagle, A. N., Cheung, M. C., ... Heinecke, J. W. (2007). Shotgun proteomics implicates protease inhibition and complement activation in the antiinflammatory properties of HDL. *The Journal of clinical investigation*, 117(3), 746–756.
- Van Acker, B. a C., Botma, G.-J., Zwinderman, A. H., Kuivenhoven, J. A., Dallinga-Thie, G. M., Sijbrands, E. J. G., ... Verhoeven, A. J. M. (2008). High HDL cholesterol does not protect against coronary artery disease when associated with combined cholesteryl ester transfer protein and hepatic lipase gene variants. *Atherosclerosis*, 200(1), 161–7.
- Van der Velde, A. E., Brufau, G., & Groen, A. K. (2010). Transintestinal cholesterol efflux. *Current opinion in lipidology*, 21(3), 167–71.
- Vanhamme, L., Paturiaux-Hanocq, F., Poelvoorde, P., Nolan, D. P., Lins, L., Van Den Abbeele, J., ... Pays, E. (2003). Apolipoprotein L-I is the trypanosome lytic factor of human serum. *Nature*, 422(March), 83–87.
- Verdier, C., Martinez, L. O., Ferrières, J., Elbaz, M., Genoux, A., & Perret, B. (2013). Targeting high-density lipoproteins: Update on a promising therapy. *Archives of cardiovascular diseases*, 106(11), 601–11.
- Vergeer, M., Korpmaal, S. J., Franssen, R., Meurs, I., Out, R., Hovingh, G. K., ... Kuivenhoven, J. A. (2011). Genetic variant of the scavenger receptor BI in humans. *The New England Journal of Medicine*, 364, 136–145.
- Vickers, K. C., Palmisano, B. T., Shoucri, B. M., Shamburek, R. D., & Remaley, A. T. (2011). MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nature cell biology*, 13(4), 423–433. s

- Vickers, K. C., & Remaley, A. T. (2013). Functional Diversity of HDL Cargo. *Journal of lipid research*.
- Voight, B. F., Peloso, G. M., Orho-Melander, M., Frikke-Schmidt, R., Barbalic, M., Jensen, M. K., ... Johnson, T. (2012). Plasma HDL cholesterol and risk of myocardial infarction: a mendelian randomisation study. *Lancet*, 380(9841), 572–80.
- Von Eckardstein, A. (2006). Differential diagnosis of familial high density lipoprotein deficiency syndromes. *Atherosclerosis*, 186, 231–239.
- Wagner, J., Riwanto, M., Besler, C., Knau, A., Fichtlscherer, S., Röxe, T., ... Dimmeler, S. (2013). Characterization of levels and cellular transfer of circulating lipoprotein-bound microRNAs. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 33(6), 1392–401. Wagner J, Riwanto M, Besler C, et al. Ch.
- Wallace, C., Newhouse, S. J., Braund, P., Zhang, F., Tobin, M., Falchi, M., ... Munroe, P. B. (2008). Genome-wide association study identifies genes for biomarkers of cardiovascular disease : serum urate and dyslipidemia. *The American society of human genetics*, 82(January), 139–149.
- Wang, H., Jiang, M., & Qiu, J. (2010). Quantitative assessment of the effect of hepatic lipase gene polymorphism on the risk of coronary heart disease. *Archives of medical research*, 41(5), 383–90.
- Wang, J., Ban, M. R., & Hegele, R. a. (2005). Multiplex ligation-dependent probe amplification of LDLR enhances molecular diagnosis of familial hypercholesterolemia. *Journal of lipid research*, 46(2), 366–72.
- Wang, K., Edmondson, A. C., Li, M., Gao, F., Qasim, A. N., Devaney, J. M., ... Rader, D. J. (2011). Pathway-Wide Association Study Implicates Multiple Sterol Transport and Metabolism Genes in HDL Cholesterol Regulation. *Frontiers in genetics*, 2(July), 41.
- Wang, L., Jacobsen, S. E. W., Bengtsson, A., & Erlinge, D. (2004). P2 receptor mRNA expression profiles in human lymphocytes, monocytes and CD34+ stem and progenitor cells. *BMC immunology*, 5, 16.
- Wang, L., Olivecrona, G., Götberg, M., Olsson, M. L., Winzell, M. S., & Erlinge, D. (2005). ADP acting on P2Y13 receptors is a negative feedback pathway for ATP release from human red blood cells. *Circulation research*, 96(2), 189–96.
- Wang, N., Robaye, B., Agrawal, A., Skerry, T. M., Boeynaems, J.-M., & Gartland, A. (2012). Reduced bone turnover in mice lacking the P2Y(13) receptor of ADP. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 26(1), 142–52.
- Wang, S., & Peng, D. (2012). Regulation of adipocyte autophagy--the potential anti-obesity mechanism of high density lipoprotein and ApolipoproteinA-I. *Lipids in health and disease*, 11, 131.

- Waterworth, D. M., Ricketts, S. L., Song, K., Chen, L., Zhao, J. H., Ripatti, S., ... Lim, N. (2010). Genetic variants influencing circulating lipid levels and risk of coronary artery disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 30(11), 2264–76.
- Weisgraber, K. H., Bersot, T. P., Mahley, R. W., Franceschini, G., & Sirtori, C. R. (1980). A-Milano apoprotein. Isolation and characterization of a cysteine-containing variant of the A-I apoprotein from human high density lipoproteins. *The Journal of clinical investigation*, 66(5), 901–907.
- Weissglas-Volkov, D., & Pajukanta, P. (2010). Genetic causes of high and low serum HDL-cholesterol. *Journal of lipid research*, 51(8), 2032–57.
- Wheeler, R. J. (2010). The trypanolytic factor-mechanism, impacts and applications. *Trends in parasitology*, 26(9), 457–64.
- Whetzel, A. M., Sturek, J. M., Nagelin, M. H., Bolick, D. T., Gebre, A. K., Parks, J. S., ... Hedrick, C. C. (2010). ABCG1 deficiency in mice promotes endothelial activation and monocyte-endothelial interactions. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 30(4), 809–17.
- Wikipedia. Fiche “Cholestérol.” Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag. Retrieved October 26, 2013, from <http://fr.wikipedia.org/wiki/Cholest%C3%A9rol>
- Willer, C. J., Sanna, S., Jackson, A. U., Scuteri, A., Bonnycastle, L. L., Clarke, R., ... Abecasis, G. R. (2008). Newly identified loci that influence lipid concentrations and risk of coronary artery disease. *Nature genetics*, 40(2), 161–9.
- Xu, J., Zhao, J., Evan, G., Xiao, C., Cheng, Y., & Xiao, J. (2012). Circulating microRNAs: novel biomarkers for cardiovascular diseases. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 90(8), 865–75.
- Yang, H., Mohamed, A. S. S., & Zhou, S.-H. (2012). Oxidized low density lipoprotein, stem cells, and atherosclerosis. *Lipids in health and disease*, 11(1), 85.
- Yano, S., Tsukimoto, M., Harada, H., & Kojima, S. (2012). Involvement of P2Y13 receptor in suppression of neuronal differentiation. *Neuroscience letters*, 518(1), 5–9.
- Yasuda, T., Ishida, T., & Rader, D. J. (2010). Update on the Role of Endothelial Lipase in High-Density Lipoprotein Metabolism, Reverse Cholesterol Transport, and Atherosclerosis. *Circulation Journal*, 74(11), 2263–2270.
- Yazdanyar, A., Yeang, C., & Jiang, X.-C. (2011). Role of phospholipid transfer protein in high-density lipoprotein-mediated reverse cholesterol transport. *Current atherosclerosis reports*, 13(3), 242–8.
- Yokota, H., Hashimoto, Y., Okubo, S., Yumoto, M., Mashige, F., Kawamura, M., ... Nakahara, K. (2002). Apolipoprotein A-I deficiency with accumulated risk for CHD but no symptoms of CHD. *Atherosclerosis*, 162, 399–407.

- Yoshida, H., & Kisugi, R. (2010). Mechanisms of LDL oxidation. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 411(23-24), 1875–82.
- Yoshida, K. (2002). Angiopoietin-like protein 4 is a potent hyperlipidemia-inducing factor in mice and inhibitor of lipoprotein lipase. *The Journal of Lipid Research*, 43(11), 1770–1772.
- Young, S., & Mceneny, J. (2001). Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Biochemical Society transactions*, 29, 358–362.
- Zambon, A., Deeb, S. S., Hokanson, J. E., Brown, B. G., & Brunzell, J. D. (1998). Common variants in the promoter of the hepatic lipase gene are associated with lower levels of hepatic lipase activity, buoyant LDL, and higher HDL2 cholesterol. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 18, 1723–1729.
- Zannis, Vassilis, Kateifides, A., Fotakis, P., Zanni, E., & Kardassis, D. (2012). *Dyslipidemia - From prevention to treatment - chapitre 9 (Pleiotropic functions of HDL lead to protection from atherosclerosis and other diseases)*.
- Zannis, VI, Chroni, A., & Krieger, M. (2006). Role of apoA-I, ABCA1, LCAT, and SR-BI in the biogenesis of HDL. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 84(4), 276–294.
- Zhang, F. L., Luo, L., Gustafson, E., Palmer, K., Qiao, X., Fan, X., ... Monsma, F. (2002). P2Y₁₃: identification and characterization of a novel Gα_i-coupled ADP receptor from human and mouse. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 301(2), 705–13.
- Zhang, Y., McGillicuddy, F. C., Hinkle, C. C., O'Neill, S., Glick, J. M., Rothblat, G. H., & Reilly, M. P. (2010). Adipocyte modulation of high-density lipoprotein cholesterol. *Circulation*, 121(11), 1347–55.
- Zhu, H., & Fan, G.-C. (2011). Extracellular/circulating microRNAs and their potential role in cardiovascular disease. *American journal of cardiovascular disease*, 1(2), 138–149.
- Zippel, N., Limbach, C. A., Ratajski, N., Urban, C., Luparello, C., Pansky, A., ... Tobiasch, E. (2012). Purinergic receptors influence the differentiation of human mesenchymal stem cells. *Stem cells and development*, 21(6), 884–900.
- Zuk, O., Hechter, E., Sunyaev, S. R., & Lander, E. S. (2012). The mystery of missing heritability: Genetic interactions create phantom heritability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(4), 1193–8.

ABSTRACT

From mice to Human: from endocytosis of lipoprotein HDL through the F₁ATPase-P2Y₁₃ pathway until genetic variants impacting HDL metabolism and their association to cardiovascular risk factor

The atheroprotective properties of HDL particles are mostly attributed to their role in the reverse cholesterol transport (RCT), a process whereby excess cell cholesterol is taken up from the arterial wall and processed into HDL for further uptake and catabolism by the liver. We previously described a new pathway for HDL uptake by hepatocytes: apolipoprotein A-I binding to an ecto-F₁-ATPase generates extracellular ADP, which specifically activates the P2Y₁₃ receptor and finally triggers HDL holoparticle uptake (protein and lipid moieties).

In the present work, hepatic expression of genes involved in cholesterol metabolism was analysed in mice, following inactivation or stimulation of P2Y₁₃. Inactivation of P2Y₁₃ was obtained by gene deletion (knock-out) and stimulation of P2Y₁₃ was achieved by using cangrelor, a partial agonist of P2Y₁₃. The importance of P2Y₁₃ receptor in RCT was confirmed since we observed in these conditions that different hepatic genes involved in lipid metabolism were modulated.

In parallel, the case-control study GENES on coronary stable patients allowed us to link a single nucleotide polymorphism (SNP rs1500588) of hepatic lipase to coronary heart disease in normotriglyceridemic patients. Furthermore, rs3732757 (synonymous mutation, I80I) located in the *P2RY13* gene was found associated to a cardioprotective phenotype. Altogether these results confirm the potential physiological relevance of the P2Y₁₃ pathway in HDL metabolism in human.

VERDIER Céline

DIRECTEURS DE THESE : Pr PERRET Bertrand - Dr MARTINEZ Laurent

Université Paul Sabatier (Toulouse) - 14 janvier 2014

De la souris à l'homme : de l'endocytose des lipoprotéines HDL *via* la voie de la F₁ATPase-P2Y₁₃ aux variants géniques impactant le métabolisme du HDL et leur association au risque cardio-vasculaire

Le rôle athéroprotecteur du HDL est principalement attribué à sa fonction dans le transport retour du cholestérol des cellules vers le foie où il est éliminé. Nous avons décrit une voie d'endocytose hépatique des HDL impliquant l'activation par l'apolipoprotéine A-I d'une ecto-F₁-ATPase qui stimule ensuite le récepteur P2Y₁₃ puis l'endocytose des HDL.

Nous avons étudié les modulations d'expression génique dans le foie de souris invalidées pour P2Y₁₃ ou traitées par un agoniste de P2Y₁₃. Nous avons observé des mécanismes adaptatifs impliquant des gènes du métabolisme lipidique confirmant ainsi le rôle physiologique de P2Y₁₃. Nous avons aussi étudié des polymorphismes des gènes codant la lipase hépatique (rs1500588) et P2Y₁₃ (rs1466684 et rs3732757) dans une étude cas-témoins GENES de patients coronariens. Nous avons observé un lien entre rs1500588 et maladie coronarienne chez les sujets normotriglycéridémiques. Concernant P2Y₁₃, rs3732757 serait lié à un phénotype cardioprotecteur.

Mots-clés : HDL, P2Y₁₃, transport retour du cholestérol, mutation silencieuse, lipase hépatique

Discipline administrative : physiopathologie

Ecole doctorale : biologie, santé, biotechnologies

Unité de recherche : INSERM – UMR1048 – I2MC – équipe 5, 1 avenue Jean Poulhès, BP 84225, 31432 Toulouse Cedex 4